UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS V
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE

ANNÉE 1970-1971

THÈSE

SÉRIE U · N° 492

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPÉRIMENTALE
DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS V

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS V

par

Jacques LEYMARIE

L'hydroxyproline urinaire en biologie clinique

Soutenue le 25 Mars 1971

Jury : Messieurs M.-L. GIRARD — Président
J.-E. COURTOIS, C. DREUX — Examinateurs

IMPRIMERIE CHASTRUSSE & Cie, 19-BRIVE

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS V

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

ANNEE 1970-1971 SERIE U - N° 492

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS V

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS V

par

Jacques LEYMARIE

L'HYDROXYPROLINE URINAIRE EN BIOLOGIE CLINIQUE

Soutenue le 25 Mars 1971

JURY : Messieurs M.L. GIRARD — Président
J.E. COURTOIS, C. DREUX — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur Maurice Louis GIRARD

Professeur de Biochimie Appliquée à la Faculté

des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris V

Pharmacien Chef de l'Hôpital Lariboisière

Chevalier de la Légion d'Honneur

qui me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse après avoir bien voulu m'accepter dans son service de Biochimie Appliquée en m'aidant de ses encouragements et de ses conseils.

Qu'il veuille bien agréer mes hommages respectueux et reconnaissants.

A Monsieur le Professeur Jean Emile COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris V

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Officier de la Légion d'Honneur

Inspecteur Général des Pharmacies de l'Assistance Publique à Paris.

qui a bien voulu accepter de juger ce travail et de lui accorder le bénéfice de sa haute compétence scientifique.

Qu'il veuille bien croire à l'expression de ma respectueuse et profonde gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543511_0029

A Monsieur le Professeur Claude DREUX

Maître de Conférences Agrégé de Biochimie Appliquée

à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de PARIS

Directeur de l'U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale

Pharmacien Chef de l'Hôpital St-Louis.

qui m'a accueilli dans son Laboratoire
comme Interne, puis Attaché de Biologie.
Il a bien voulu me confier ce travail et m'a
constamment guidé, conseillé et largement aidé

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de
ma reconnaissance et de mon respectueux et
fidèle attachement.

A mes parents

A ma femme

A mes enfants

A mes frères et soeurs

A mes amis

en témoignage de ma profonde affection

TABLE DES MATIERES

Introduction

Chapitre 1 - L'Hydroxyproline dans l'organisme

1 - Répartition de l'hydroxyproline dans les tissus

A - Composition et structure des collagènes

B - Composition et structure de l'élastine

11 - Métabolisme de l'hydroxyproline

Chapitre 11- L'Hydroxyproline dans les milieux biologiques. Etude analytique

1 - L'hydroxyproline urinaire

A - Origine

B - Facteurs modifiant l'excrétion

C - Nature de l'HP urinaire

11 - L'Hydroxyproline sanguine

111 - Problèmes analytiques

A - Isolement

B - Hydrolyse

C - Dosage spécifique

1V - Etude effectuée : Solutions proposées

A - Isolement de l'HP libre

B - Hydrolyse

C - Dosage spécifique

1 - Oxydation en dérivés pyrroliques
2 - Dosage des dérivés pyrroliques formés

D - Méthode proposée pour le dosage de l'HP libre et totale dans l'urine

E - Isolement des peptides

CHAPITRE III - Variations physiologiques et pathologiques de l'HP urinaire

I - Valeurs normales chez l'adulte de l'HP urinaire

II - Variations physiologiques

A - Variations avec le sexe

B - Variations avec l'âge

C - Régime alimentaire

D - Variations au cours du Nyctemere

E - Influences hormonales

III - Variations pathologiques

A - Maladies osseuses

B - Affections parathyroïdiennes

C - Autres glandes endocrines

D - Troubles de la croissance

E - Maladies du collagène

F - Affections diverses

Conclusion

INTRODUCTION

L'hydroxyproline, composé cyclique dérivé de la pyrrolidine, est généralement classée dans le groupe des acides aminés dont elle possède un certain nombre de caractères physico-chimiques. L'intérêt que suscite depuis quelques années cette substance provient de sa localisation dans l'organisme humain, pratiquement limitée aux collagènes et à l'élastine. De ce fait, les tissus riches en ces protéines, et surtout l'os, se trouvent "marqués" par l'hydroxyproline, et leur métabolisme peut ainsi être suivi par l'étude de la fixation et de l'élimination du composé pyrrolidinique.

Le but de notre travail, après une mise au point biochimique qui fait l'objet du premier chapitre, a été :

- d'effectuer une étude analytique de l'hydroxyproline en vue de son dosage dans les milieux biologiques. La nécessité de réaliser de très nombreuses déterminations nous a ainsi conduits à mettre en oeuvre des techniques d'analyse automatique,
- de réaliser une exploration métabolique portant sur les variations physiologiques et pathologiques de l'hydroxyprolinurie.

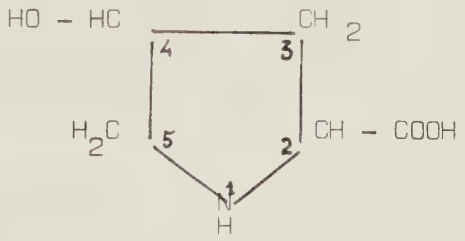
Ces deux parties de nos recherches sont rapportées dans les chapitres II et III.

CHAPITRE 1

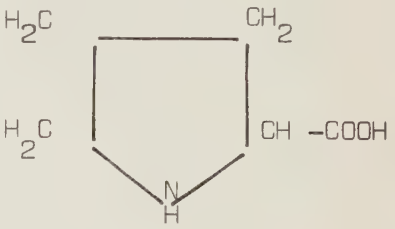
L'HYDROXYPROLINE DANS L'ORGANISME

1 - REPARTITION DE L'HYDROXYPROLINE DANS LES TISSUS

FISHER en 1902 isole l'hydroxyproline (HP) [1] d'un hydrolysat de gélatine (16). L'HP, de même que son homologue la proline (P) [11] n'est pas un véritable acide aminé, mais plutôt un imino-acide, en ce sens qu'elle renferme un NH au lieu d'un NH_2 en α de la fonction COOH. De ce fait, on n'obtient pas de dégagement d'azote avec HNO_2 par la méthode de VAN SLYKE et la ninhydrine fournit une coloration différente de celle donnée par les autres acides aminés.



HYDROXYPROLINE [1]



PROLINE [11]

Ainsi, l'HP est donc un imino-acide dont, toutefois, les caractères physico-chimiques sont suffisamment proches des amino-acides pour être classée dans ce groupe.

L'HP naturelle est l'acide pyrrolydine-hydroxy-4 carboxylique 2. Cette structure entraîne une stéréo-isomérie, due aux carbones 2 et 4 asymétriques, qui permet de prévoir 4 formes actives :L HP (forme naturelle), l'allo HP, D HP, et D allo HP. L'hydroxy 4 proline est la plus répandue; toutefois OGLE (59) et collaborateurs ont isolé l'hydroxy 3 proline des tendons de bovidés.

Si la proline peut se trouver dans les prolamines (gliadine, zéine), les collagènes, la gélatine, la fibroïne de la soie, l'HP, par contre, est plus rare et n'est pratiquement rencontrée que dans les collagènes et l'élastine.

L'HP se trouve essentiellement localisée dans le collagène où elle représente environ 14 % des acides aminés totaux, et en plus faible quantité dans l'élastine. De fait de sa distribution très

importante, et presque unique, dans le collagène vient l'idée d'utiliser l'HP pour suivre le métabolisme normal et pathologique du collagène.

A - Composition et structure des collagènes

Les collagènes constituent les protéines de structure des tissus conjonctifs et on les rencontre dans les tendons, ligaments, cartilages, peau et os. L'os contient à lui seul près de la moitié du collagène humain.

Les collagènes sont de composition différente suivant les tissus. Ils doivent leur nom au fait que, chauffés avec de l'eau, ils sont dégradés en colle dont la principale est la gélatine.

Ce sont des scléro-protéines peu solubles dans l'eau, solubles dans les tampons à pH 4-5, et difficilement touchés par les réactifs des protéines.

1 - Composition

Rappelons pour exemple la composition du tendon d'achille des bovidés (24) :

- Eau	63 %	- Glycoprotéines	0,5 %
- Collagène	31,6 %	- Lipides	1 %
- Elastine	1,6 %	- Divers	2,3 %

La composition de certains collagènes en acides aminés est connue. EASTOE, par exemple, rapporte (13) la composition du collagène d'os humain (ou de gélatine commerciale d'os).

Une étude plus récente de TRISTAN et SMITH (77 b.) confirme en grande partie ces résultats (Tabl. 1)

Les collagènes sont riches en glycine (1/3 environ) proline et HP qui représentent 1/4 à 1/3 des acides aminés totaux. Ils renferment également de l'hydroxylysine, de faibles quantités de tyrosine et de cystéine ; quant au tryptophane, il est généralement absent.

TABLEAU N° 1

	Collagène (os humain)	Gélatine commerciale (os)
Hydroxyproline	108	101,00
Proline	127,2	134,4
Glycine	337	363
Alanine	117	126
Valine	22,7	23,7
Leucine	29,9	26,3
Isoleucine	13,2	11,7
Sérine	40,5	35,5
Thréonine	21,1	19,8
Phénylalanine	17,5	15,1
Tyrosine	3,1	1,3
Cystine	0	0
Méthionine	5,5	4,2
Acide aspartique	53,4	50,5
Acide glutamique	81,2	78,6
Histidine	6,2	4,5
Arginine	52,5	51,9
Lysine	28,1	29,9
Hydroxylysine	6,9	4,7
TOTAL	1.071,6	1.082,3

Acides aminés du collagène et de la gélatine d'os (en mole/10^5 g de protéine) d'après ESTOE (13)

2 - Hydrolyse enzymatique

L'action des enzymes protéolytiques est assez difficile, comme nous aurons l'occasion de le démontrer dans la partie analytique. D'après certains auteurs, la pepsine agit lentement en milieu chlorydrique et la trypsine n'est active qu'après action préalable de la pepsine ou à température supérieure à 40° C. Chymo-trypsine et pronase n'hydrolysant qu'en partie le collagène, par contre des micro-organismes secrètent des collagénases assez spécifiques (76).

3 - Transformation en gélatine

Chauffé dans l'eau ou avec un acide dilué, le collagène se transforme en gélatine. Il s'agit essentiellement d'une modification de structure, la composition chimique demeurant pratiquement inchangée, et les phénomènes hydrolytiques étant minimes. Le point isoélectrique est cependant modifié : 4,7 à 5 contre 6,6 à 6,8 pour les collagènes.

4 - Structure

Les collagènes sont formés de fibres, de diamètre voisin du micron, elles-mêmes subdivisées en fibrilles. Dans l'enchaînement des acides aminés, la séquence la plus fréquente est : glycine-hydroxyproline-proline (9). Mais la proline peut être remplacée par un autre amino-acide. La collagénase de clostridium histolyticum qui coupe les liaisons X - P - R$\downarrow$ G - P - X entre R et G (P = Proline ou HP, G = Glycine ou alamine, R = autre amino-acide) a permis d'intéressantes découvertes sur l'enchaînement des acides aminés dans les peptides du col-

lagène (39 bis) (76 bis). Des études récentes ont conduit à l'isolement à partir de collagène de rat (peau) de chaînes α contenant 7 restes de méthionine ; la coupure de ces chaînes par le bromure de cyanogène a donné 8 peptides dont on a pu établir la structure. Finalement la séquence des premiers 5 1 amino-acides de la chaîne a été déterminée (8 bis). On y retrouve des enchaînements du type HP - Gly - Pro - HP - Gly - Ala - HP - Gly - Pro et Pro - HP - Gly - Glu - HP - Gly - Glu - HP - Gly

L'étude aux rayons X (33) a montré une périodicité de 2,86 Å correspondant à une disposition spatiale de 3 chaînes peptidiques enroulées en hélice (73) - (Fig. 1)

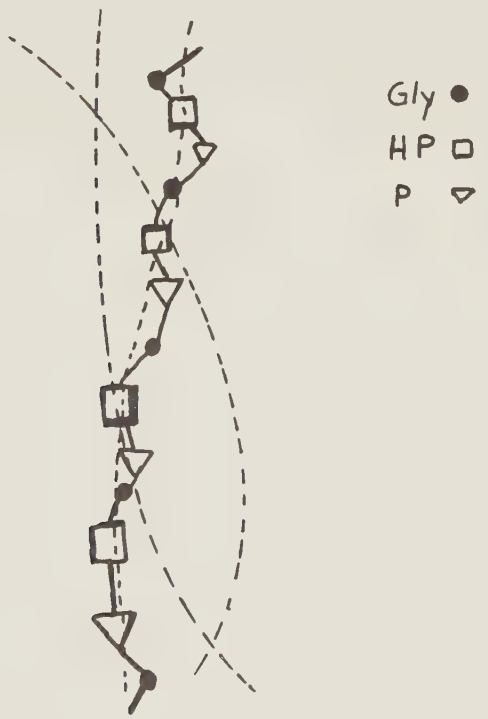


Fig. 1 - Schéma de la structure du collagène d'après RICH et CRICK (73)

En plus des liaisons peptidiques ou imino-peptidiques des chaînes principales, il existe des liaisons ester entre les groupes carboxyliques des acides dicarboxyliques et le groupement OH de l'HP ou de l'hydroxylysine. Les chaînes peptidiques comprennent environ 1.000 acides aminés (poids moléculaire voisin de 100.000).

Les chaînes d'amino-acides se rassemblant par 3, suivant une disposition hélicoïdale, forment le "tropocollagène" de poids moléculaire voisin de 300.000 (17) (25). La taille de cette molécule serait d'environ 2.900 Å de long sur 14 Å de diamètre (39 bis).

Le collagène soluble est constitué de fibres de collagène récemment formées ; il est facilement extractible par les solutions froides d'électrolytes (25). Par la suite, des liaisons supplémentaires se forment entre les différentes fibres et l'on obtient le collagène insoluble (29). Tout ceci se déroule, en fait, en différentes étapes caractérisées chacune par une extractibilité par l'eau de plus en plus faible du collagène, en rapport avec la formation des liaisons supplémentaires entre les différentes fibres (79) (63).

PROCKOP et KIVIRIKKO (68) ont décrit l'incorporation de l'HP dans les fibres de collagène.

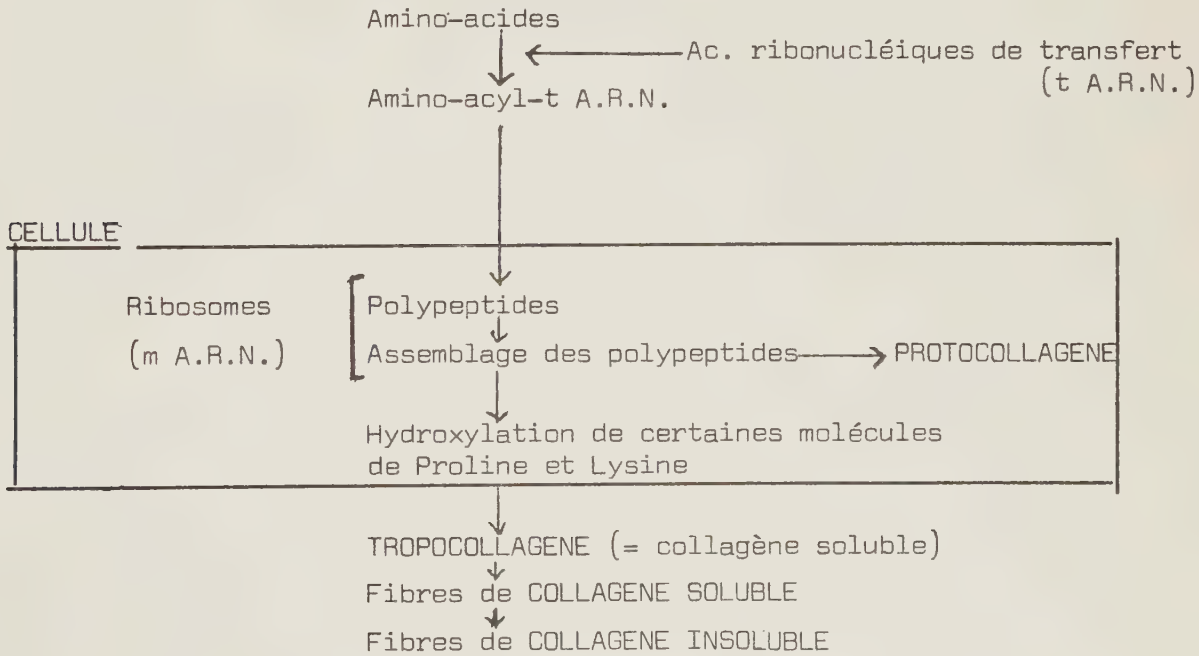


Fig. 2 - Schéma de la biosynthèse du collagène

Le RNA de transfert réaliserait tout d'abord l'enchaînement des différents amino-acides en amino-acyl-ARN, puis il y aurait assemblage des polypeptides du protocollagène (riche en proline et lysine) dans les ribosomes contenant le RNA messager (80). Ensuite, certaines molécules de proline et de lysine seraient hydroxylées en hydroxyproline ou hydroxylysine (62) (64). Enfin, le tropocollagène ainsi formé serait rejeté à l'extérieur de la cellule et il se constituerait alors le collagène soluble, puis insoluble. Le protocollagène correspondrait donc au collagène, à la différence que la proline et la lysine y remplaceraient l'hydroxyproline et l'hydroxylysine. Signalons que KAKIMOTO et AKAZAWA ont isolé récemment de l'urine les glucosylgalactosyl - et galactosyl δ - hydroxylysine (30 bis). L'HP résulterait donc d'une hydroxylation de la proline d'une chaîne peptidique déjà constituée.

Plusieurs auteurs, signalant la présence de quantité notable d'HP libre ou de peptides à HP dans les tissus où la synthèse du collagène est rapide, avaient pensé qu'il pouvait s'agir de précurseurs du collagène ; cependant, grâce aux éléments marqués, il a été établi qu'il s'agissait en fait de produits de dégradation du collagène (28).

B - Composition et structure de l'élastine

L'élastine est surtout riche en glycine et en proline qui avec alanine, valine, leucine représentent 80 % des acides aminés totaux. L'élastine est le constituant majeur du tissu élastique (32 %), celui-ci ne comportant que 7 % de collagène. L'élastine résiste bien à l'hydrolyse par les acides ou les protéases, mais elle est hydrolysée par l'élastase. (Tableau II)

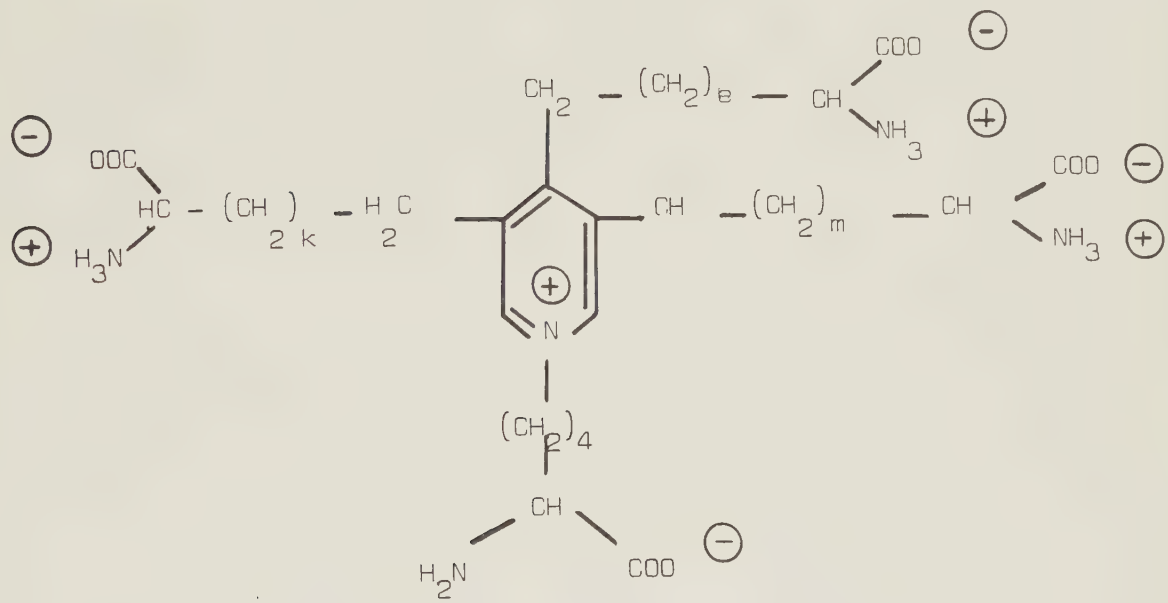
La structure est sensiblement différente de celle du collagène. L'examen au microscope électronique ne montre pas la périodicité transversale observée pour les fibres de collagène. Par contre, il existe entre les différentes chaînes peptidiques des ponts particuliers leur permettant de glisser les unes sur les autres en leur donnant ainsi l'élasticité.

TABLEAU II

Hydroxyproline	1,6	Tyrosine	1,5
Proline	13,5	Cystine	0,35
Glycine	26,7	Méthionine	traces
Alanine	21,3	Ac. aspartique	1,1
Valine	17,7	Ac. glutamique	2,4
Leucine	9,0	Histidine	---
Isoleucine	3,8	Arginine	1,3
Sérine	0,85	Lysine	0,5
Thréonine	1,12	Glucosamine	0,05
Phénylalanine	6,2	Galactosamine	0,05

ACIDES AMINES DE L'ELASTINE (en g/100 g de protéine)

D'après PARTRIDGE (61), le lien entre ces chaînes peptidiques serait réalisé par un dérivé pyrimidique, la desmosine (ou l'isodesmosine). [111] dont le précurseur serait la lysine.



Formule 111 - Structure de la desmosine

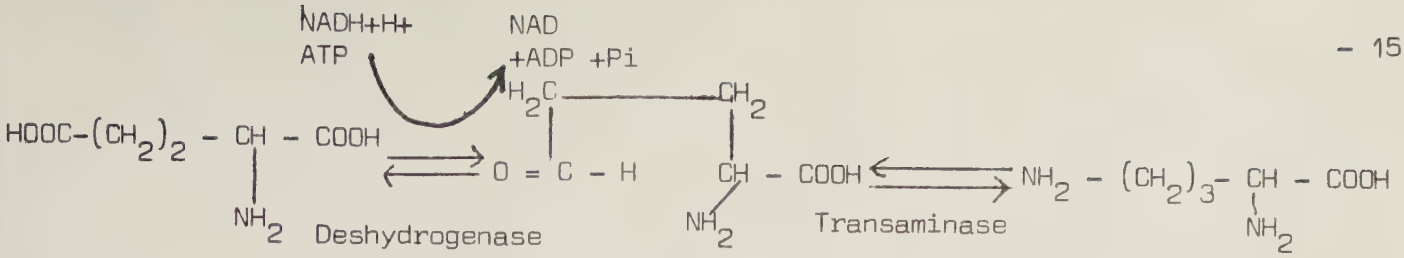
II - METABOLISME DE L'HYDROXYPROLINE

L'hydroxyproline est synthétisée dans l'organisme et, si une partie est éliminée à l'état libre ou peptidique, une autre fraction est catabolisée. Au point de vue de la biosynthèse, nous avons déjà indiqué que la proline était hydroxylée au niveau des peptides et des protéines déjà formées, selon un processus irréversible. (Fig. 3).

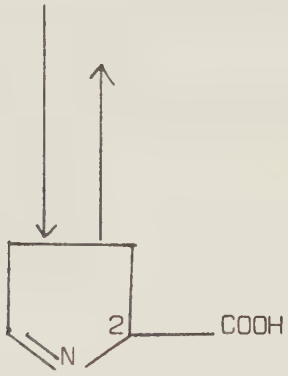
Au point de départ de la synthèse de la proline dans l'organisme, on trouve l'acide glutamique et l'ornithine qui, par réduction ou transamination, conduisent au semi-aldehyde glutamique, en équilibre avec l'acide Δ 5 pyrroline carboxylique-2. La réduction de ce dernier conduit à la proline, puis à l'hydroxyproline. Dans cette hydroxylation interviendrait l'acide ascorbique (Fig. 3)

Le catabolisme de l'HP (Fig. 4) débute par l'action de l'HP oxydase formant l'acide Δ 5 pyrroline hydroxy-4-carboxylique-2. Puis l'on passe à l'acide δ semi-aldehyde-hydroxy-4-glutamique, et par déshydrogénation à l'acide hydroxy-4-glutamique ; une transamination conduit à l'acide cétonique correspondant et la chaîne de dégradation se termine par la formation des acides glyoxylique et pyruvique. (Fig. 4)

Bien que les réactions de biosynthèse et de catabolisme présentent des analogies, les phénomènes enzymatiques sont distincts et auraient lieu dans des régions différentes de la cellule.



Ac. glutamique — semi ald. glutamique — ornithine



Ac. Δ_5 pyrroline carboxylique-2

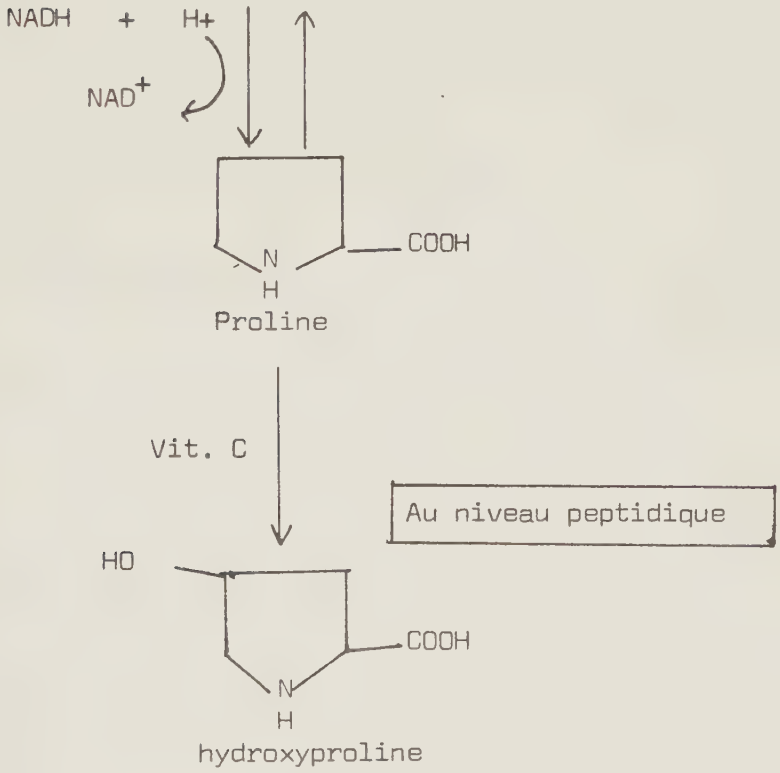


Fig. 3 - Biosynthèse de l'hydroxyproline

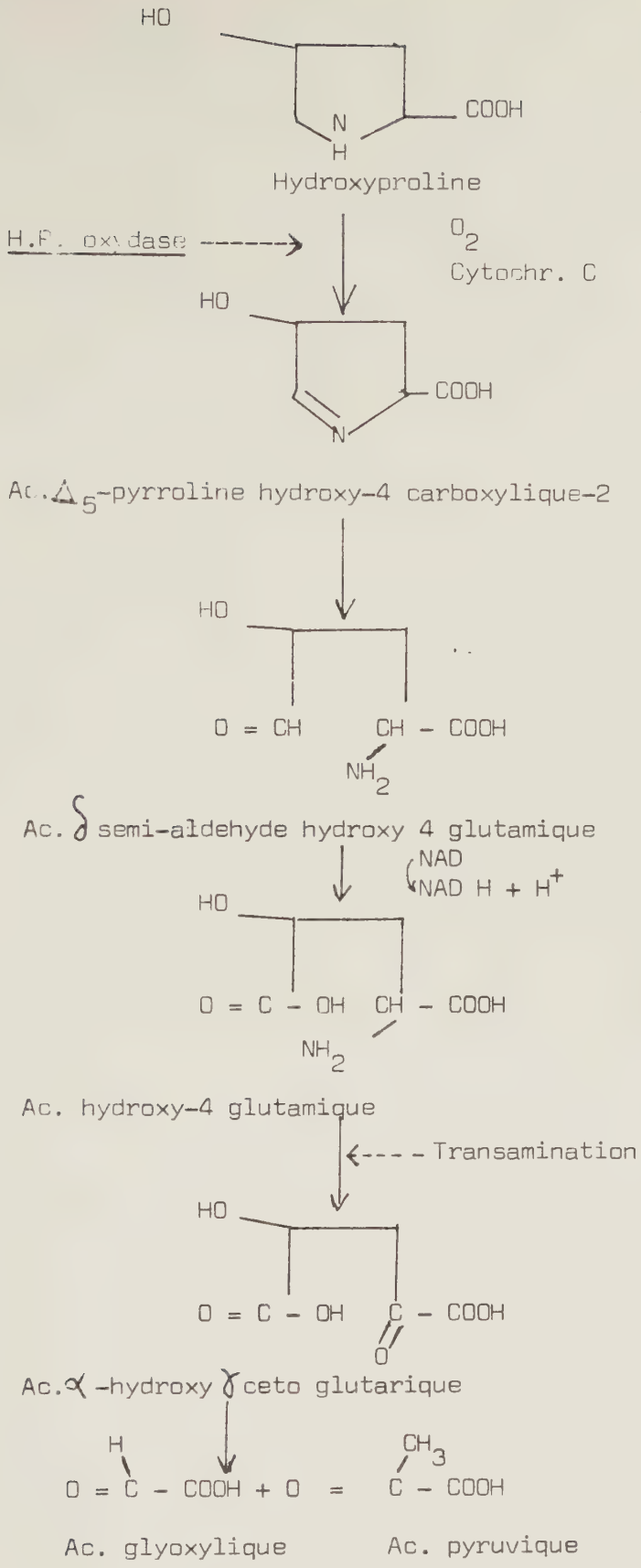


Fig. 4 - Catabolisme de l'hydroxyproline

CHAPITRE II

L'HYDROXYPROLINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES
ETUDE ANALYTIQUE.

I - L'HYDROXYPROLINE URINAIRE

A - Origine

Si l'ingestion de grandes quantités de gélatine augmen l'excrétion urinaire d'HP (83) par contre, un régime pauvre en protéines n diminue pas sensiblement la quantité d'amino-acide excrétée. D'autre part, la quasi totalité de l'HP urinaire se trouve sous forme peptidique, et l'a sorption de fortes quantités d'HP libre, si elle provoque une élévation de l'HP urinaire libre, ne modifie pas la fraction peptidique. Les états d' hyperhydratation ou de déshydratation ne semblent pas, non plus, interveni dans l'élimination.

Cet ensemble de faits suggère que l'excrétion d'HP est indépendante des facteurs influant sur l'élimination des autres acides aminés, et que l'HP de l'urine provient essentiellement de la dégradation du collagène, origine confirmée par les expériences réalisées par LINSTED et PROCKOP avec de l'HP marqué au carbone 14 (45). D'après cette étude, un tiers au moins de l'HP urinaire proviendrait du collagène"soluble" récem- ment synthétisé (composante rapide de demi-vie voisine de 1 jour) alors qu deux tiers environ proviendraient du collagène "insoluble" (composante len de demi-vie de 50 à 300 jours).

D'autres auteurs pensent que seulement 5 à 10 % du col- lagène insoluble dégradé sont retrouvés dans l'urine, le reste étant méta- bolisé en d'autres acides aminés ou éliminé sous forme d'urée et de CO_2 (10 Cependant, ces pourcentages peuvent varier largement en fonction notamment de la provenance du collagène. Certains auteurs signalent enfin la présenc dans l'urine de peptides n'ayant pas la même séquence en acides aminés que le collagène (49). Ce fait peut s'expliquer par la connaissance imparfaite de la structure du collagène, par la présence de fragments résultant d'un clivage transversal des fibres du collagène ou encore par l'altération des peptides libérés (50).

Ainsi l'hydroxyproline urinaire paraît provenir en presque totalité de la dégradation du collagène de divers tissus. Parmi ceux-ci, l'os occupe une place prépondérante étant donné sa richesse en

collagène et la constance de son remaniement (12).

B - Facteurs modifiant l'excrétion

Une augmentation des taux d'HP dans l'urine peut avoir des causes diverses (68) :

- Augmentation de la synthèse du collagène ① ②
- Diminution de la vitesse de conversion du collagène soluble en collagène insoluble ③ ④
- Augmentation de la vitesse de dégradation du collagène insoluble en forme plus soluble ④' ③'
- Augmentation de la vitesse de dégradation des différentes formes de collagène en peptides libres ou HP ⑤ ⑥ ⑦
- Diminution de la vitesse relative avec laquelle les peptides à HP sont dégradés en HP libre et éventuellement en urée et CO_2. ⑧ ⑨

Il est possible, en combinant les explorations isotopiques et les dosages, d'obtenir des informations sur les variations du métabolisme du collagène (fig. 5).

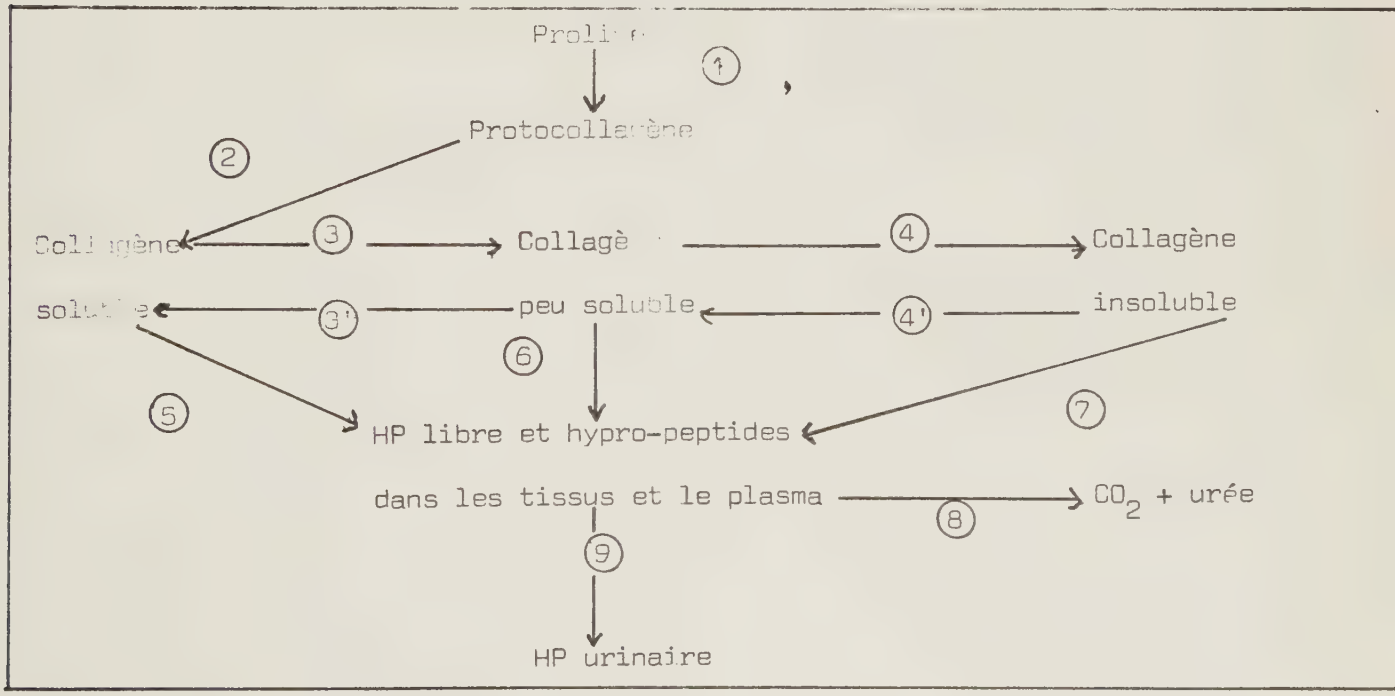
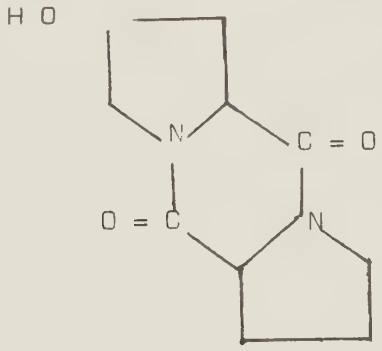


Fig. 5 : Schéma du métabolisme du collagène

C - Nature de l'hydroxyproline urinaire

La dégradation du collagène provoque l'élimination dans l'urine de l'adulte d'hypro-peptides (95 à 97 % du total) et d'une faible proportion d'HP libre. Chez le nouveau né, l'HP libre peut atteindre une proportion de 45 % (56) ; il s'agirait pour MEILMAN (56) d'un phénomène d'immaturation rénale. Une douzaine de peptides urinaires ont été isolés, mais 90 % à 95 % de l'hydroxyproline totale sont représentés par 3 peptides (51) - (34) - (49).

a) - Un dipeptide proline-hydroxyproline pouvant exister sous forme dicétopiperazinique (60 % environ).



b) - Un tripeptide acide glutamique hydroxyproline acide glutamique (15 % du total).

c) - Un tripeptide glycine proline hydroxyproline (15 %).

Nous avons vu que les séquences proline hydroxyproline et glycine proline hydroxyproline étaient particulièrement abondantes dans les molécules de collagène.

On a pu également caractériser une petite quantité de peptides non dialysables (5 % à 10 %) suggérant la présence de composés de taille plus importante que ceux précédemment décrits. KRANE a isolé de l'urine d'un pagétique un polypeptide d'un poids moléculaire de 8000, contenant hydroxyproline, glycine et hydroxylysine (66).

Certains glycopeptides à HP ont été également décrits (20

Les peptides urinaires ont été particulièrement bien étudiés par MEILMAN et Coll. (51) sur des urines de sujets sains et dans quelques cas pathologiques. Ces auteurs ont réalisé une séparation par chromatographie sur DOWEX, suivant une technique que nous décrirons plus loin. Six fractions ont été isolées (Fig. 6)

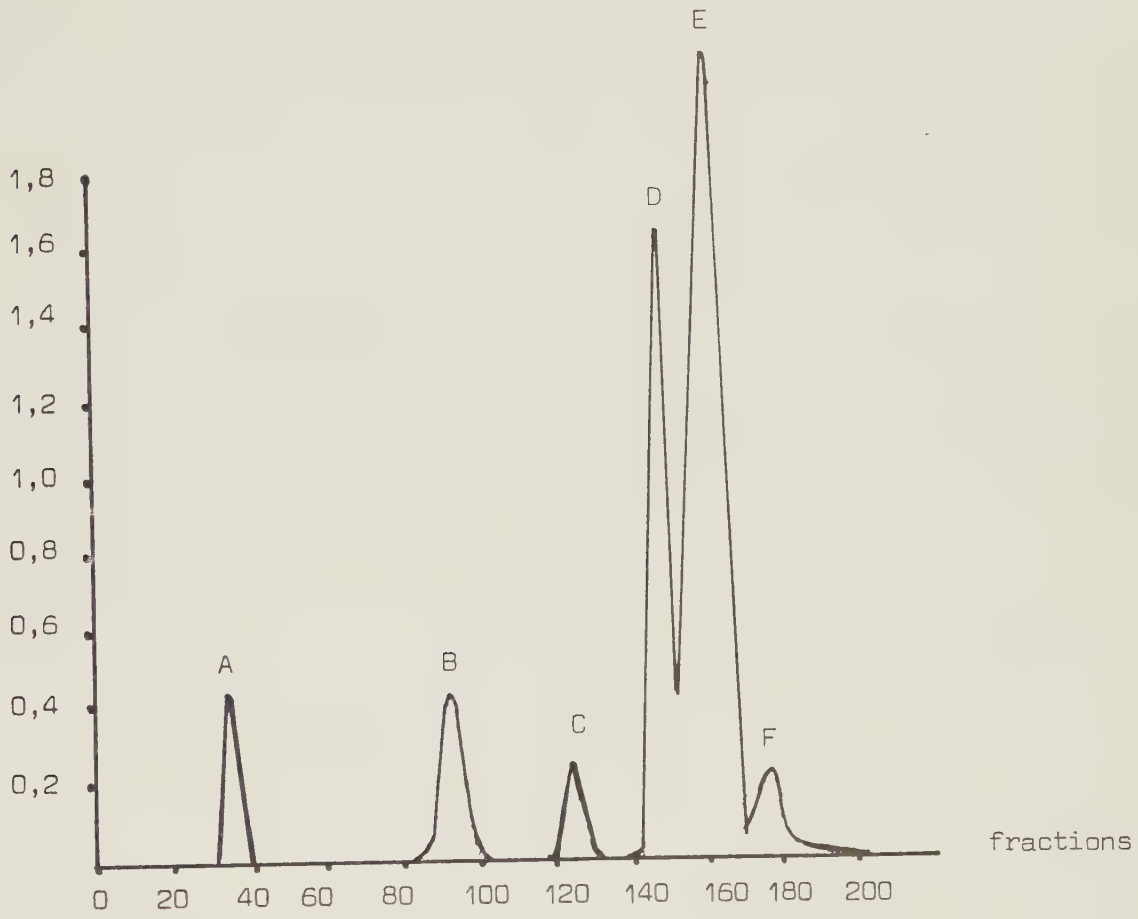


Fig. 6 : Séparation chromatographique des hypropeptides dans l'urine d'un sujet normal (régime riche en hydroxyproline) d'après MEILMAN et Coll. (81).

Fraction A : Elle renfermerait la forme dicétopipérazinique (naturelle ou produite au cours de l'analyse) du dipeptide hydroxyproline-proline.

Fraction B : Elle contient uniquement de l'hydroxyproline libre. Ce pic, en effet, disparaît lors des régimes sans hydroxyproline.

Fraction C : Il s'agit d'un pic correspondant à un hypropeptide dont la composition en amino-acides n'a pas encore été élucidée. Il contiendrait, entre autres, de l'acide glutamique. Son absence a été constatée dans certains syndromes (lupus érythémateux, sclérodermie).

Fraction D : Elle représente, chez l'adulte normal, environ 20 % des peptides et semble composée d'au moins trois hypropeptides. Le plus important de ceux-ci (75 %) est le tripeptide : acide glutamique-hydroxyproline acide glutamique.

Fraction E : Normalement, ce pic contient à peu près 65 % des peptides isolés dans l'urine et paraît constitué en totalité par le dipeptide : proline-hydroxyproline.

Fraction F : Un seul peptide est présent dans cette fraction. Il s'agit du tripeptide : glycine-proline-hydroxyproline. (environ 3 % des peptides totaux)

Les valeurs obtenues ainsi correspondent sensiblement à celles indiquées précédemment, hormis pour le tripeptide glycine proline hydroxyproline (15 %) qui n'apparaît ici que dans le pic F pour une valeur de 3 %

Nous exposerons plus loin nos résultats sur un essai de fractionnement des peptides urinaires par chromatographie sur SEPHADEX.

II - L'HYDROXYPROLINE SANGUINE

Dans le plasma humain, l'hydroxyproline serait présente sous trois états : libre - liée sous forme de peptides - liée sous forme de protéines.

- la forme libre représente 1,5 mg/litre environ
- la forme peptidique, 0,6 mg/litre
- la plus grosse partie est liée aux protéines, 80 % du total, soit 8 mg/litre.

Cette dernière fraction n'est pas dialysable et précipit avec les réactifs habituels des protéines ; son poids moléculaire est supérieur à 200.000 et elle migre à l'électrophorèse avec les α_2 globuline (1

Cette hyproprotéine est résistante à l'action enzymatiqu de la pronase qui agit habituellement sur les autres protéines plasmatiques Cette propriété se trouve partagée avec les précurseurs du collagène solubl laissant supposer que cette protéine est un précurseur de celui-ci ou une protéine voisine (42), ce qui est confirmé par la parenté des propriétés immunologiques avec le collagène acido-soluble de la peau (18)

III - PROBLEMES ANALYTIQUES

Dans les liquides biologiques, nous venons de voir que l'HP peut se présenter sous plusieurs formes, libre, lié à des peptides ou à des protéines. Le dosage spécifique pose de nombreux problèmes et nécessite un certain nombre d'opérations analytiques.

A - Isolement

Il s'agit, soit d'isoler l'hydroxyproline contenue dans un hydrolysat peptidique ou protéique, soit encore d'isoler les différents peptides contenant de l'hydroxyproline avant de les analyser séparément.

B - Hydrolyse

Pour l'hydroxyproline urinaire totale, la première opération à réaliser sera l'hydrolyse qui doit être complète, sans se montrer toutefois trop agressive pour détruire l'imino-acide.

Cette hydrolyse pourra s'appliquer au produit biologique ou à des fractions peptidiques obtenues par chromatographie. Le collagène étant une protéine difficile à hydrolyser, on devra souvent faire appel à des réactions différentes de celles utilisées pour l'étude générale des protéines.

C - Dosage spécifique

Pour un dosage spécifique des produits hydrolysés, l'ensemble des techniques proposées met en jeu des réactions d'oxydation sélectives conduisant à des dérivés pyrroliques. Les dérivés pyrroliques formés sont ensuite appréciés, généralement par colorimétrie.

Pour l'HP libre, il se pose souvent des problèmes d'isolement et de caractérisation, plus délicats du fait de la complexité des milieux naturels ; par suite, la spécificité est généralement moins bonne.

Pour isoler les peptides à HP, on fait appel à la chromatographie, la caractérisation particulière de chaque fraction se faisant, à nouveau, après hydrolyse par chromatographie des différents acides aminés présents.

1V - ETUDE EFFECTUEE ET SOLUTIONS PROPOSEES

A - Isolement de l'Hydroxyproline libre

Nous envisagerons sommairement la séparation de l'HP des autres acides aminés, qui peut être intéressante dans le cadre de certaines amino-acido-pathies.

Pour les mélanges d'acides aminés, on s'adresse généralement à une séparation sur résine échangeuse d'ions, suivant le schéma de STEIN et MOORE (55).

Nous utilisons une technique à l'auto analyseur Technicon dérivée de celle de PADIEU et MALEKNIA (60). Cette méthode a été appliquée par les auteurs (19) à la chromatographie analytique préparative de la proline et de l'hydroxyproline pour l'étude de métabolisme du collagène, grâce à une résine de polystyrène sulfoné (DOWEX 50 x 8) ; l'élution est réalisée par un système de tampons volatils à base de pyridine et d'acide formique dont le gradient de pH est compris entre 2,9 et 5. Dans ces conditions opératoires, l'hydroxyproline et la proline sont les deux premiers acides aminés élués. En modifiant les tampons d'élution, on peut obtenir un isolement parfait de l'acide aminé choisi.

Pour notre part, le système tampon utilisé est du type acide citrique-citrate de sodium dont le gradient de pH varie de 2,9 à 5(6

Après chromatographie, les acides aminés sont caractérisés par la réaction à la ninhydrine. Dans les conditions opératoires utilisées (ninhydrine en solution dans le méthyl-cellosolve et un tampon de pH 5,5, en présence d'hydrindantine), le maximum d'absorption se trouve situé à 440 mm pour la proline et l'hydroxyproline et à 570 mm pour les autres acides aminés.

La chromatographie est réalisée sur une résine de type chromobeads A (longueur de la colonne 1,40 m) pendant 20 heures et permet d'obtenir une bonne séparation des amino-acides. (Fig. 7).

B - Hydrolyse

Dans les milieux biologiques que nous étudions, en particulier l'urine, l'hydroxyproline existe sous forme de peptides et de protéines. Différentes techniques ont été proposées pour son hydrolyse. C'est généralement l'hydrolyse acide qui est préconisée.

PROCKOP et UDENFRIEND (71) proposent une hydrolyse à 124° en tubes scellés pendant 3 heures.

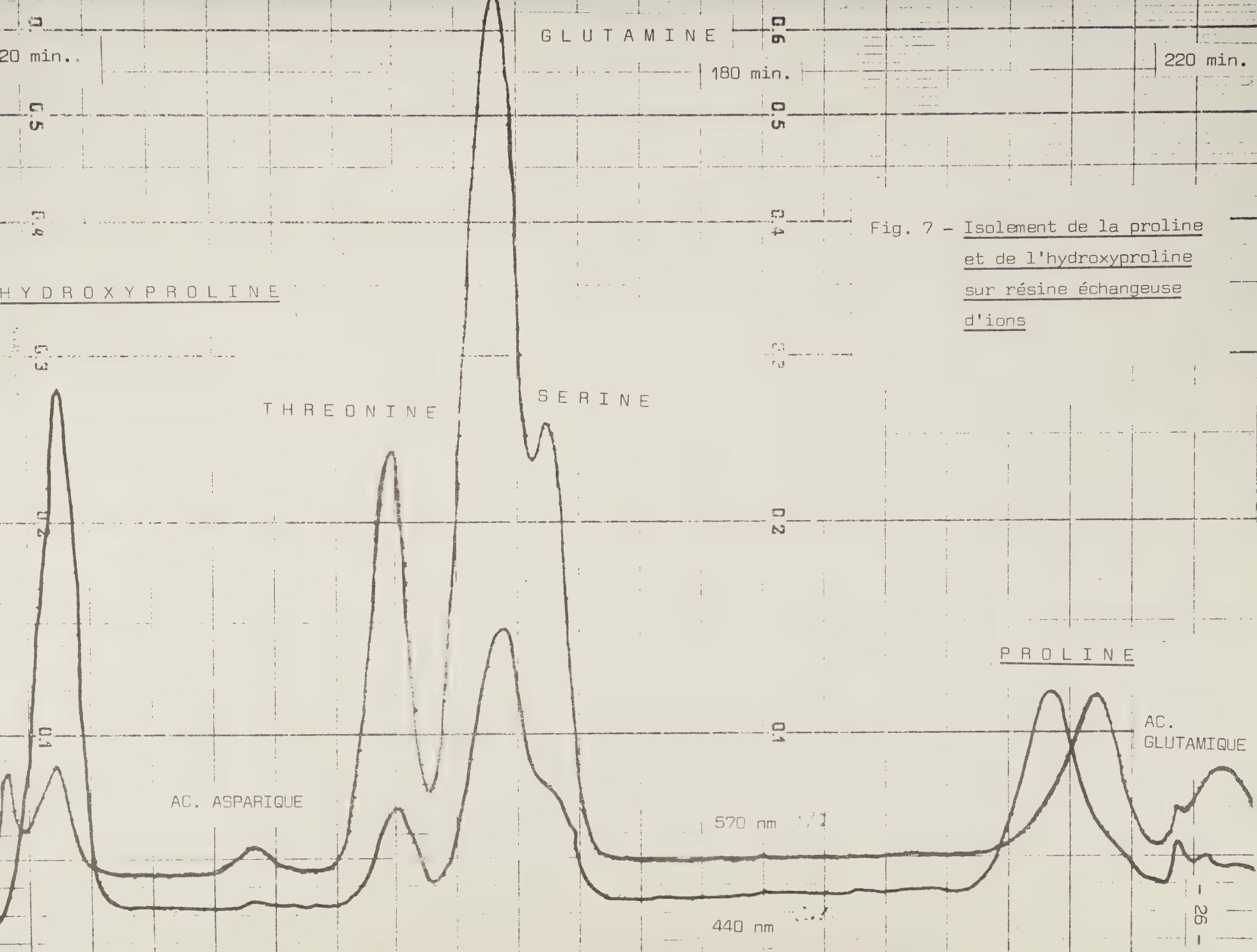


Fig. 7 - Isolement de la proline et de l'hydroxyproline sur résine échangeuse d'ions

STEGMAN et KARLHEIN (81) utilisent également l'acide chlorydrique 6N mais en chauffant 16 heures à 107°.

NEUMAN et LOGAN (58) opèrent avec l'acide chlorydrique mais à l'autoclave pendant 3 heures ; d'après ces auteurs, le rendement décroît après 8 heures d'hydrolyse.

FILLIAT, COTTE et BRUNET adoptent la méthode de PROCKOP et UDENFRIEND mais en la prolongeant 12 heures, car ils jugent l'hydrolyse incomplète après 3 heures (15).

Enfin, MITOMA, SMITH et DAVIDSON opèrent en milieu alcalin avec de la baryte concentrée, pendant 12 heures, sous une pression de 1,2 kg (52).

Après différents essais, nous avons conclu que les conditions proposées par PROCKOP et UDENFRIEND étaient tout à fait convenables pour l'hydrolyse de l'hydroxyproline dans l'urine. En effet, à partir d'une solution de poly-hydroxyproline, nous avons effectué une hydrolyse et un dosage qui nous ont donné un rendement de 100 %. Le protocole finalement adopté est le suivant :

Urine et acide chlorydrique concentrés sont mélangés à partie égale, puis placés dans des ampoules que nous recommandons de chauffer avant leur fermeture (dégazage) ; les ampoules sont placées à l'étuve à 125° c pendant 3 heures. Dans ces conditions, nous estimons que la totalité de l'hydroxyproline est hydrolysée. Un essai réalisé sur plusieurs urines montre le pourcentage d'hydrolyse obtenu en faisant varier le temps de chauffage. (Tab. III).

Durée de chauffage	Pourcentages d'hydrolyse obtenus
$\frac{1}{2}$ heure	7 %
1 heure	21 %
1 heure et demie	57 %
2 heures	85 %
2 heures et demie	100 %
3 heures	100 %
24 heures	100 %

TABLEAU III - Pourcentages d'hydrolyse obtenus en fonction du temps avec HCL 6N en tubes scellés.

Trois heures sont donc suffisantes, puisqu'au bout de 2 heures 30, la récupération atteint déjà 100 %. Un chauffage plus prolongé n'apporte pas de modifications sensibles, ni en plus ni en moins. Pour vérifier que la totalité de l'hydroxyproline contenue dans l'urine est bien retrouvée après l'hydrolyse, nous avons surchargé des urines avec une solution pure d'hydroxyproline. Puis nous avons pratiqué l'hydrolyse habituelle. De cette manière, nous retrouvons la totalité de l'hydroxyproline ajoutée. (Tab. 1V).

	Urine pure	Urine surchargée
Résultats théoriques	50 mg/l	$\frac{U + S}{2}$ = 75 mg/l
Résultats obtenus (technique automatique)	50 mg/l	75 mg/l

TABLEAU 1V

L'enregistrement représenté (Fig. 8) montre le résultat obtenu avec une urine hydrolysée normalement puis, avec une surcharge d'hydroxyproline.

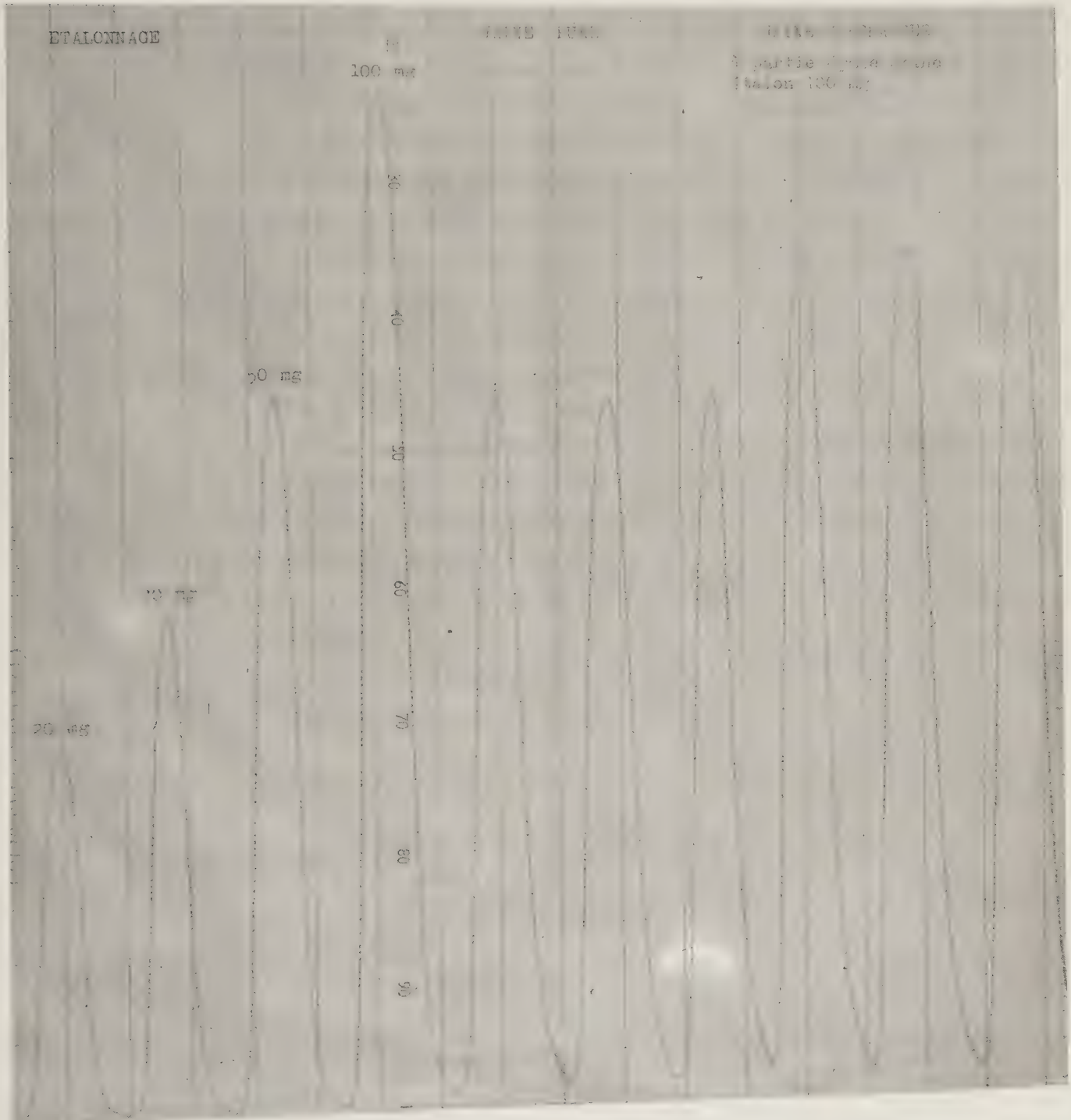


Fig. 8 - Récupération de surcharge sur urine hydrolysée.

Dans le but d'automatiser complètement le dosage de l'hydroxyproline urinaire, nous avons tenté de réaliser une hydrolyse automatique à l'aide de l'autoanalyseur Technicon (voir schéma de montage - fig. 9). Nous avions ainsi intercalé une bobine placée dans un bain marie à température réglable avant le montage habituel. L'urine, mélangée à un acide où une base forte était introduite dans la bobine, puis, à la sortie, l'hydrolysat, après neutralisation, était envoyé dans le circuit habituel. Malheureusement, l'hydrolyse alcaline, même dans des conditions élevées de température (et de pression) ne nous a donné que des résultats par défaut. L'acide sulfurique s'est révélé inutilisable, car donnant très rapidement un charbonnement et des dépôts incompatibles avec l'emploi d'un autoanalyseur. Les pourcentages d'hydrolyse les plus élevés et les plus proches de la technique en ampoules scellées décrites plus haut prise comme référence, ont été obtenus avec HCL 10 N à 125° pendant 1 heure 30. Dans ces conditions, encore insuffisantes, on est obligé de mettre en oeuvre un montage délicat et dangereux à manipuler, difficilement utilisable dans les conditions habituelles. Nous pensons qu'une solution pourrait être trouvée par l'emploi d'un minéralisateur type "Vis sans fin" utilisé pour le dosage de l'iode protéique ou du phosphore lipidique. Les essais avec ce montage sont en cours.

Les conditions et résultats de nos expériences d'hydrolyse sont résumés dans le tableau V.

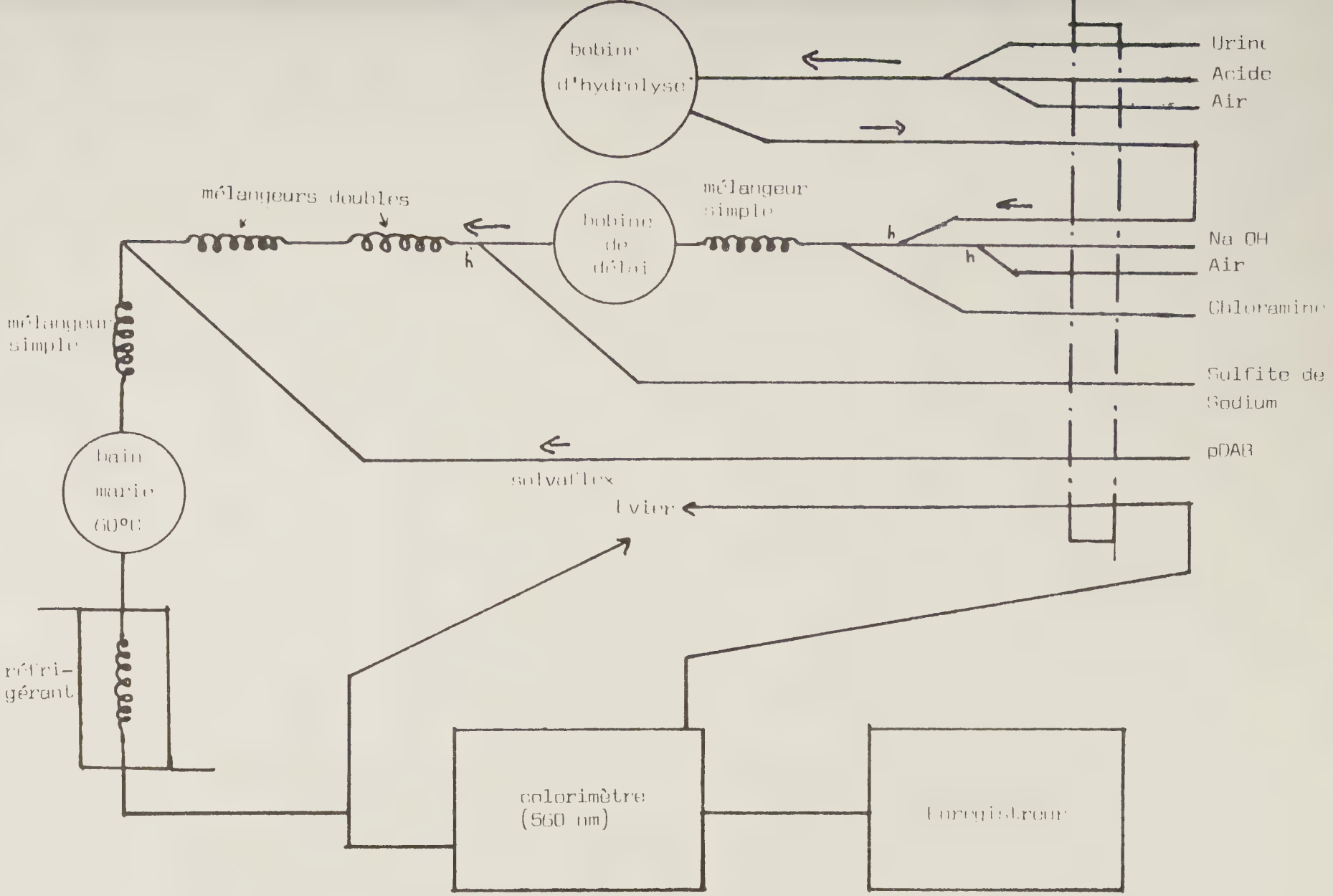


Fig. 9 - Schéma de montage pour dosage avec hydrolyse automatique de l'urine

	U_1	U_2	U_3	U_4	U_5	U_1	U_2	U_3	U_4	U_5	Moyennes
HCL 6 N 3 h. Ampoules scellées	50 mg/1	135	145	190	130	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
	TECHNIQUE MANUELLE PRISE COMME TECHNIQUE DE REFERENCE										
NaOH 15 % 1 heure 30 95°	25	47	47	63	29	50 %	34 %	32 %	33 %	22 %	34 %
Ethanol 60 - 1h30 Butanol 20 KOH 20 70°	20	20	20	20	20						30 %
HCL 6 N 1 heure 30 95°	22	46	42	60	38	44 %	34 %	29,5 %	31,5 %	29 %	33 %
HCL 6 N 125° 30'	18	30	28	38	20	36 %	22 %	19 %	20 %	15 %	22 %
HCL 6 N 125° 1 heure 30	25	80	67	140	80	50 %	59 %	46 %	76 %	61 %	58 %
HCL 125° 1 heure 30	38	82	100	144	96	76 %	60 %	69 %	75 %	73 %	70 %

TABLEAU V - Pourcentages d'hydrolyse obtenus à l'autoanalyseur avec différentes conditions opératoires, par comparaison avec la technique manuelle.

Certains auteurs préconisent l'addition de charbon activé après hydrolyse pour éliminer une partie des pigments. Nous avons négligé volontairement cette manipulation qui ne nous semble pas apporter d'amélioration sensible.

C - DOSAGE SPECIFIQUE

1 - Oxydation en dérivés pyrroliques

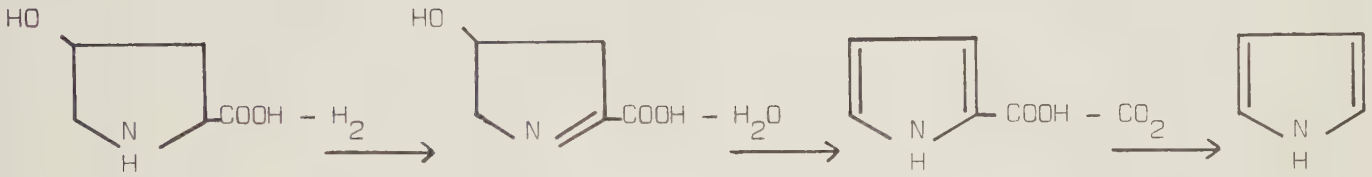
Les différentes méthodes de dosage de l'hydroxyproline utilisent une oxydation sélective avec des oxydants doux, tels que la chloramine T ou l'eau oxygénée en solution diluée ; seul, le dérivé hydroxylé (HP) subit l'oxydation, la proline restant inattaquée.

Pour cette oxydation, NEUMAN et LOGAN (58) emploient l'eau oxygénée dans une technique que nous avons essayée et qui donne de bons résultats. Nous l'avons cependant abandonnée car elle est inapplicable à l'auto-analyseur ; l'eau oxygénée donne, en effet, des dégagements gazeux qui perturbent le cheminement des flux. Comme STEGMAN (10) nous utilisons la chloramine T qui présente l'avantage d'être facilement décomposée et de ne pas intervenir ensuite dans la réaction colorée. En effet, après un temps d'oxydation déterminé, l'excès d'oxydant doit être détruit pour ne pas perturber le dosage, une oxydation trop poussée pouvant conduire à la formation de polymères du pyrrole. Il est cependant nécessaire, pendant l'oxydation, de travailler avec un large excès d'oxydant. On observe en effet avec certains médicaments (sulfamides et corticoïdes notamment) que les valeurs obtenues sont inférieures aux valeurs normales, une partie de l'oxydant étant consommé à leur profit.

Pour être stoechiométrique et applicable au dosage, l'oxydation doit être effectuée pendant un temps déterminé, puis interrompue à son terme par un réducteur approprié : sulfate ferreux (46), thiosulfate de sodium (71), acide perchlorique (22). Nous avons d'abord utilisé ce dernier, mais il donne souvent lieu, avec les hydrolysats d'urine, à des précipitations gênantes en technique automatique. Aussi nous avons proposé le bisulfite de sodium (10). Actuellement, nous

préférons utiliser le sulfite de sodium, composé mieux défini qui nous donne entière satisfaction.

L'oxydation de l'HP par l'eau oxygénée ou la chloramine T s'effectue selon la réaction suivante : (Fig. 10).



hydroxyproline — Ac. Δ^1 pyrroline hydroxy-4 carboxylique-2 — Ac. pyrrol carboxylique-2 — pyrrole

Fig. 10 - Oxydation ménagée de l'hydroxyproline

Par déshydrogénation de l'HP, on obtient l'acide Δ^1 pyrroline hydroxy-4-carboxylique-2, instable, qui donne l'acide pyrrole carboxylique 2 par déshydratation. Ce dernier peut ensuite se décarboxyler en pyrrole.

Si le mécanisme de la réaction chimique est bien connu, il est plus difficile d'affirmer à quel stade va s'arrêter la réaction d'oxydation, et quel sera le produit final obtenu dans les conditions opératoires. RADHAKRISHNAM (72), en utilisant le même procédé d'oxydation mais avec l'eau oxygénée, met en évidence de l'acide pyrrole carboxylique 2 par spectrophométrie et chromatographie, de même que FILLIAT, COTTE et BRUNET par chromatographie (15). PROCKOP et UDENFRIEND (71)

pensent qu'il s'agit plutôt de pyrrole. BERGMAN et LOXLEY (6) supposent qu'il ne s'agit ni de l'un, ni de l'autre de ces composés.

Pour nous, la réaction d'oxydation conduit à un mélang en proportion variable des deux composés, selon les conditions technique de l'oxydation. En augmentant la température et la durée d'oxydation, on facilite la décarboxydation finale en augmentant ainsi la quantité de pyrrole présent.

Nous avons tenté d'isoler et de caractériser les produits d'oxydation obtenus sur un soluté d'HP avec nos conditions de travail.

Après des essais infructueux d'extraction du produit d'oxydation, la chloramine T se montrant alors très gênante, nous avons essayé d'appliquer la chromatographie sur plaques avec différents solvants de migration. Les résultats obtenus sont trop peu reproductibles pour être mentionnés.

L'analyse chromatographique en phase gazeuse nous a, par contre, apporté des résultats plus intéressants et reproductibles. En utilisant une solution d'HP oxydée par la chloramine T à la température ordinaire pendant 10 minutes, et après avoir stoppé cette oxydation par du sulfite de sodium, on obtient un mélange en proportion à peu près équivalente de pyrrole et d'acide pyrrole carboxylique 2. La figure 11 montre les résultats obtenus en chromatographie en phase gazeuse avec notre solution d'hydroxyproline oxydée dans les conditions précédemment décrites. (Fig. 11).

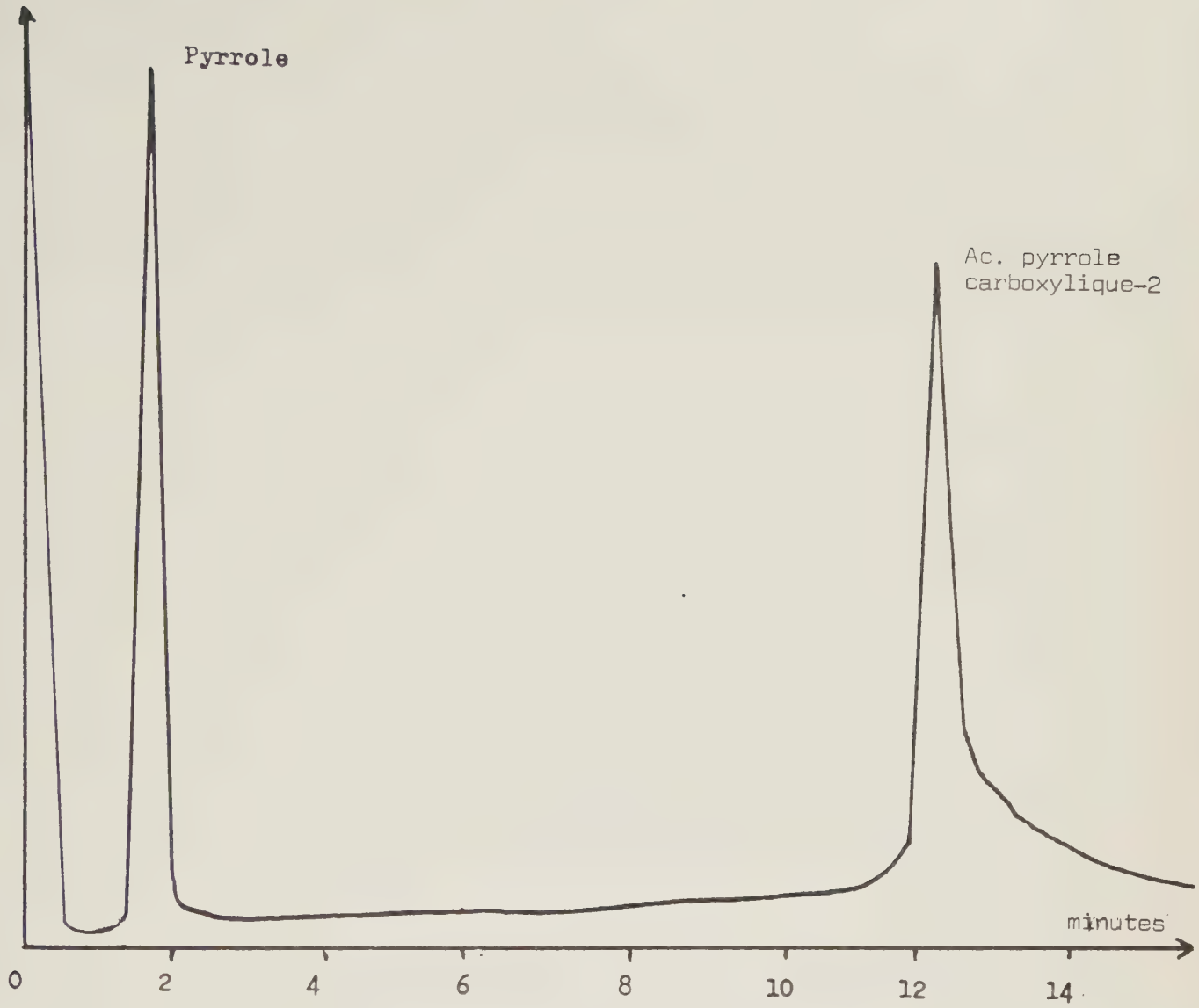


Fig. 11 — Séparation par chromatographie en phase gazeuse, des produits d'oxydation de l'hydroxyproline.

Conditions opératoires : colonne 1,2 m x 1/8 10 % D.E.G.S.
Gaz porteur : N_2 (1 - 1,5 bar) Débit H_2 : 20 ml/min.
Débit air : 350 ml/min.
T° colonne 100 - 210° C.
T° injecteur 150° C.
Programmation 10° C./min.

Chromatographe GIRDEL

2 - Dosage des dérivés pyrroliques formés

a)- Action du para-diméthyl-amino-benzaldéhyde

La réaction utilisée le plus couramment consiste à condenser les dérivés pyrroliques formés avec le para-diméthyl-amino-benzaldéhyde pDAB à chaud en milieu hydro-alcoolique-acide, conduisant à la formation d'un dérivé coloré dont le maximum d'absorption est situé à 560 - 570 nm (fig. 12).

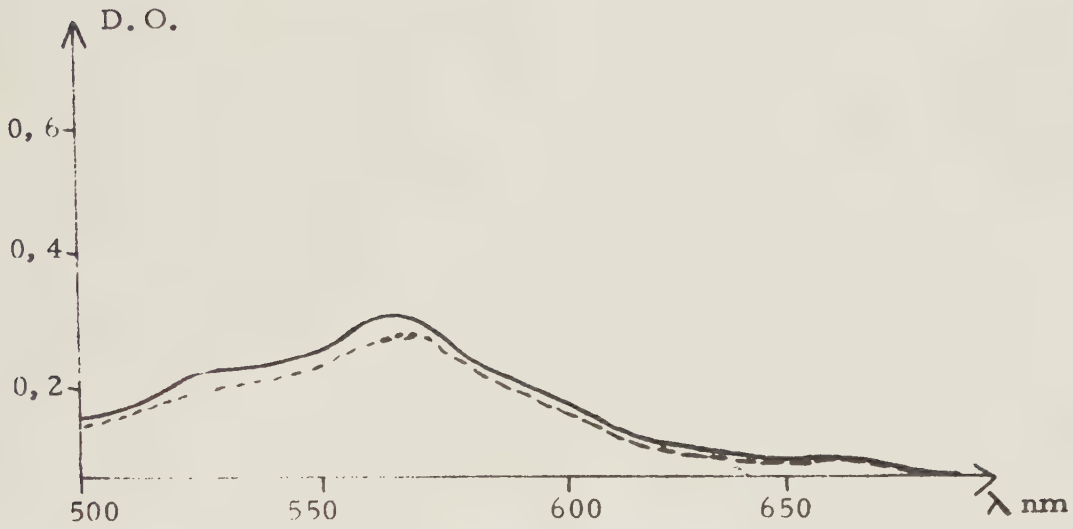


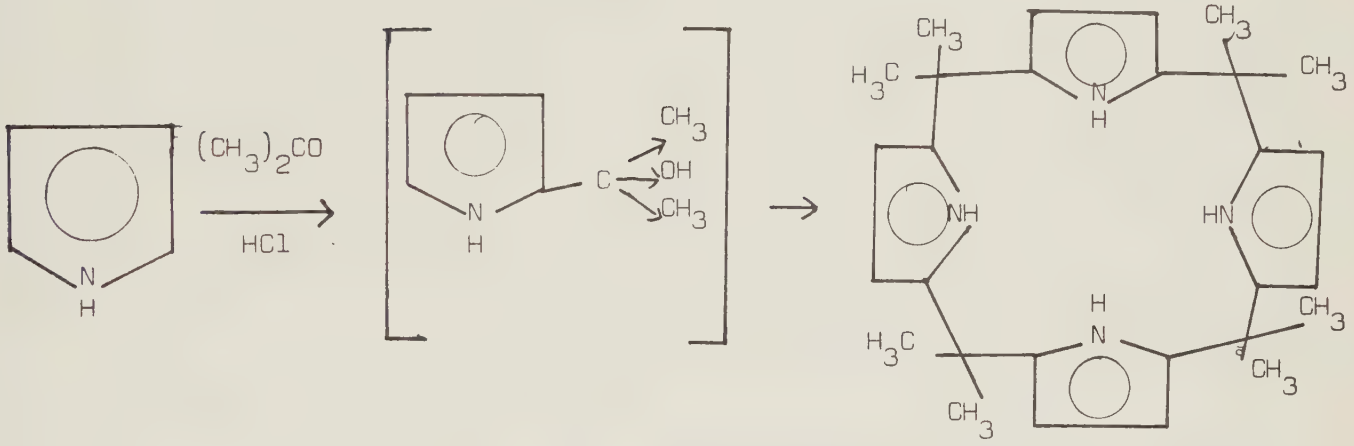
Fig. 12 - Spectres d'absorption de la coloration obtenue avec le pDAB

_____ Hydroxyproline oxydée

---------- Hydrolysat urinaire oxydé

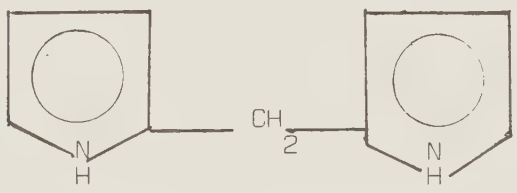
Pour tenter d'expliquer le principe de cette réaction colorée, il faut mentionner que le pyrrole est très actif pour les substitutions électrophiles qui se font de préférence sur les atomes de carbone en 2 ou en 5 (position), l'attaque en 3 ou 4 n'ayant lieu que

si les positions 2 et 5 sont bloquées. En dehors des substitutions électrophyles habituelles (nitration, sulfonation, bromation, formylation), les aldéhydes et cétones réagissent en solution acide. C'est ainsi que l'acétone, en milieu chlodydrique, conduit à l'octaméthyl-porphyrinogène [V] par une série de condensations commençant par le composé [IV] et passant par le (dipyrrolyle 2-2') - 2 propane (59).



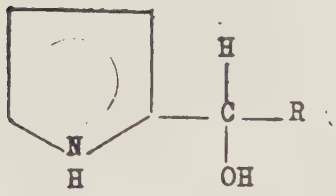
IV V

Avec l'aldehyde-formique, on aboutit au (dipyrrolyle 2-2') méthane [VI] qui, par oxydation ménagée, donne des sels de dipyrrolyle méthine, importants intermédiaires dans la synthèse des porphyrines.

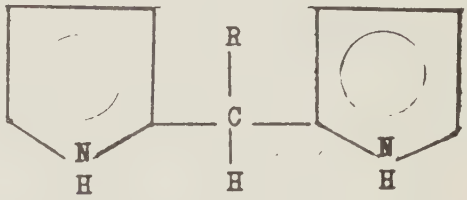


VI

Avec les aldehydes RCHO ou ArCHO, comme le pDAB, on peut donc supposer que la réaction est de même nature et conduit à des dérivés du type [VII] ou [VIII.]



[VII]



[VIII]

Dans le cas de l'acide pyrrole carboxylique 2, il reste une position libre en α qui permet également la substitution électrophile par l'aldehyde. De plus, en opérant à chaud en milieu acide, le groupement COOH labile s'élimine, expliquant ainsi l'obtention de colorations identiques avec des proportions variables de pyrrole et d'acide pyrrole carboxylique 2 produits par l'oxydation de l'HP.

b) - Recherches de nouvelles réactions de condensation

Nous avons effectué cette étude dans le but d'obtenir une technique de dosage :

- plus spécifique que celle au pDAB, cet aldehyde réagissant avec de nombreux composés,
- plus sensible, afin d'aborder notamment le dosage de l'HP dans le sang.

Nous avons ainsi recherché l'obtention de colorations et de fluorescences, cette dernière propriété pouvant conduire à des méthodes de dosage très sensibles :

α) - Fluorescence naturelle du pyrrole et de l'acide pyrrole carboxylique.

Ces composés sont eux-mêmes fluorescents. A différents pH : 2, 6, 7, 8, 12, ils donnent un spectre d'excitation avec un maximum à 430 nm et un spectre de fluorescence dont le maximum est à 510 nm.

Fig. 13 - Spectres d'excitation et de fluorescence d'une solution de pyrrole obtenus à l'aide d'un spectrofluorimètre (S.F. Béarn. Jobin et Yvon)

Cependant, l'intensité de la fluorescence par rapport à la concentration est trop faible pour permettre des applications dans le dosage de l'hydroxyproline.

β) - Réaction avec divers aldehydes :

On opère avec des solutions alcooliques d'aldehyde, en milieu acide et à 60° C. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI

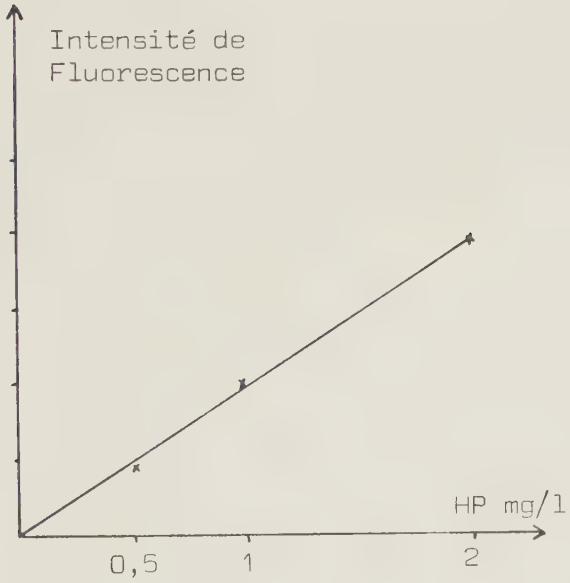
Aldehydes	Coloration	Fluorescence
Benzoïque	Rose	Légère
Para-nitrobenzoïque	Rose	Néant
Cinnamique	Verte	Néant
Anisique	Orangée	Néant
Salicylique	Rose	Néant
Ortho-phtalique	Rose	Intense

TABLEAU VI

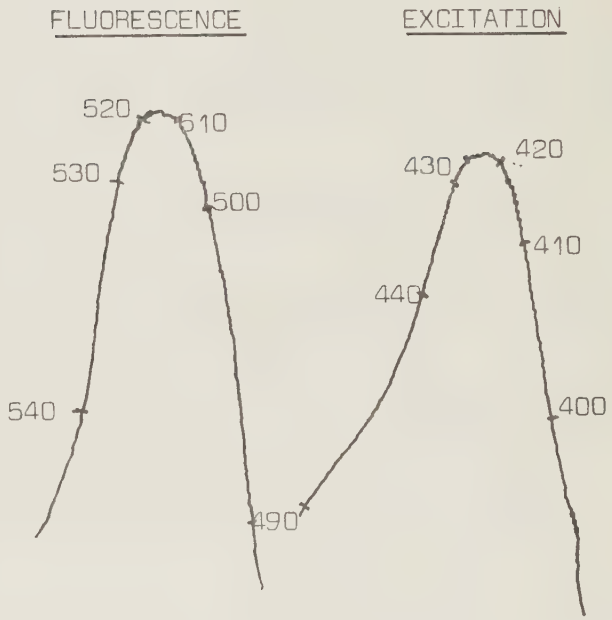
Les résultats les plus intéressants sont fournis par l'aldehyde ortho-phtalique qui donne, en présence d'acide pyrrole carboxylique, une fluorescence très importante dont le maximum d'excitation est situé à 425 nm et celui de fluorescence à 520 nm, et ce à différents pH (4, 6, 7, 8, 10, 12).

Cette fluorescence est également obtenue avec des solutions d'HP oxydées par la chloramine T, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la technique colorimétrique. Nous avons pu, ainsi, établir des gammes d'étalonnage avec des solutions d'HP oxydées (Fig. 14).

Fig. 14



a) Gamme d'étalonnage obtenue avec des solutions étalons d'HP oxydées par chloramine T et condensées avec l'ald. ophtalique.

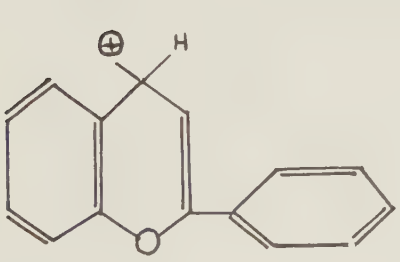


b) Spectres d'excitation et de fluorescence avec l'ald. ophtalique.

Cependant, les essais de dosage direct sur un hydrolysat d'urine se sont révélés impossibles par suite d'interférences dues en particulier à l'ammoniaque, qui n'ont pu être levées, malgré un traitement préliminaire par une résine échangeuse d'ions. Cependant, la méthode pourrait être utilisée après isolement de l'hydroxyproline après chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions ou de Séphadex, par exemple.

γ) - Action d'autres composés :

Le Perchlorate de Flavylium, dont J. BARTOS (4) a décrit les propriétés analytiques, présente une structure [1X] où apparaît un hydrogène très réactif en 4, permettant la condensation avec le pyrrol et l'acide pyrrole carboxylique 2 en donnant un composé coloré dont le maximum d'absorption est situé à 490 nm (Fig. 15).



[1X]

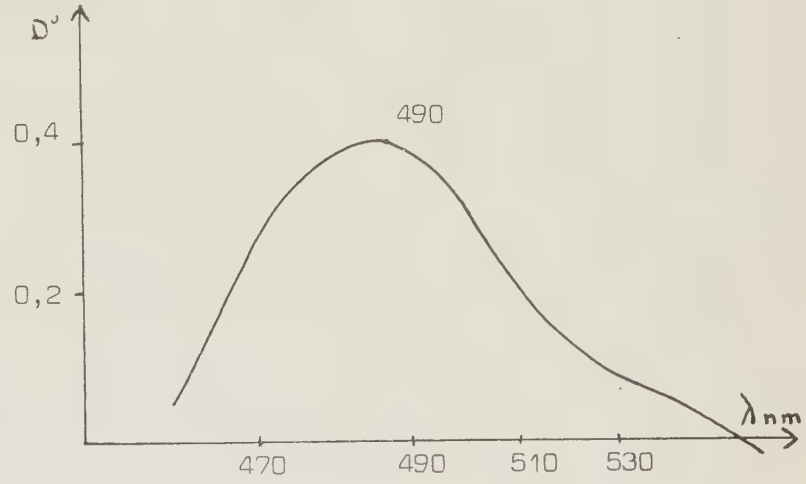


Fig. 15 - Spectre d'absorption obtenu avec le perchlorate de flavylium [1X]

Cependant, l'intensité de la coloration obtenue est environ 5 fois moins intense que celle fournie par le pDAB.

La para-benzo-quinone donne également une coloration, mais de faible intensité.

Avec l'éthylène diamine, les sels de cuivre, l'α nitroso

β naphtol, la ninhydrine après nitrosation, on n'obtient pas de coloration ni de fluorescence intéressante.

La para-phénylène diamine donne une légère fluorescence (E 355, F 410) ainsi que l'ortho-aminophénol (E 350, F 490).

c) - Réaction adoptée pour le dosage de l'hydroxyproline urinaire

Le pDAB fournissant la réaction colorée la plus intense, nous l'avons adoptée pour le dosage de l'HP urinaire malgré sa faible spécificité.

Pour éviter l'interférence de composés biologiques, lors de la réaction de caractérisation des dérivés pyrroliques formés, plusieurs auteurs ont proposé d'extraire ces dérivés pyrroliques ou les chromogènes gênants. C'est ainsi que PROCKOP et UDENFRIEND (71) proposent une double extraction par le toluène. La première est effectuée après une légère oxydation à la température ordinaire pour éliminer les impuretés, la seconde après une oxydation plus poussée à chaud pour extraire le pyrrole formé. NEUMAN et LOGAN (58) extraient l'acide pyrrolcarboxylique par l'éther. WOESNNER (82) élimine par extraction les chromogènes non pyrroliques. Certains auteurs, enfin, distillent les dérivés pyrroliques formés.

Cependant ces différents procédés allongent la méthode et nous semblent superflus pour le dosage de l'hydroxyproline urinaire en biologie clinique. Nous envisagerons plus loin le problème de la spécificité.

D - METHODE PROPOSEE POUR LE DOSAGE DE L'HP LIBRE ET TOTALE DANS L'URINE

Nous utilisons deux techniques, l'une manuelle, l'autre automatique, identiques du point de vue du principe et des réactifs ; une partie des manipulations est commune, seule la réaction colorée s'effectuant à l'auto-analyseur (10) (40)

1) - Prélèvement des urines

Les urines sont recueillies pendant 24 heures sur un antiseptique (papier imprégné de mercuro-thiolate) ou sur 5 ml d'acide chlorydrique pur, si le dosage doit être différé plus de 24 h. Ce dernier procédé assure une conservation plus longue, une semaine environ, mais risque de provoquer une hydrolyse partielle de certains peptides, provoquant ainsi une légère erreur par excès sur le taux de l'HP libre.

2) - Réactifs

Réactif I : Chloramine T

1,41 g de chloramine T sont dissous dans 80 ml d'eau. Ajouter 140 ml de méthoxy-2-éthanol, exempt de peroxydes (méthyl-cellosolve) et 200 ml de tampon pH 6 (conservation 24 heures).

Réactif II : Tampon pH 6

Acide citrique	50 g
Acide acétique pur	12 ml
Acétate de sodium	120 g
Soude (pastilles)	34 g
Eau distillée q. s. p.	1000 ml

Ajuster à pH 6 (bonne conservation au réfrigérateur).

Réactif III : Sulfite de sodium

Solution de sulfite de sodium 7 HO_2 à 6 g pour 1000 ml. (conservation 24 h. au réfrigérateur).

Réactif IV : Para diméthyl amino benzaldehyde (pDAB)

pDAB	5 g
HCL	50 ml
Ethanol	50 ml

(bonne conservation au réfrigérateur).

Réactif V : Solution étalon d'HP

Solution mère à 100 mg/litre dans l'eau distillée, légèrement acidifiée par de l'acide chlorydrique (pH 3 environ).

Solution diluée, également dans l'eau acidifiée, à 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 20 mg/litre. (bonne conservation au réfrigérateur).

3 - Mode opératoire

a)- Dosage de l'HP libre

Il est effectué directement sur l'urine filtrée.

Lorsque le prélèvement a été fait sur acide chlorydrique, surtout si la diurèse est faible, il convient de s'assurer que le pH obtenu après l'addition du réactif d'oxydation à la chloramine T est bien voisin de 6.

Dans le cas d'urines très colorées, on peut agiter celles-ci avec du charbon activé, puis filtrer ou centrifuger.

b)- Dosage de l'HP totale

Une hydrolyse en milieu acide sera effectuée selon le protocole suivant :

- Mélanger à partie égale l'urine filtrée et l'acide chlorydrique pur.
- Introduire ce mélange dans une ampoule qui est ensuite scellée.
- Placer l'ampoule à l'étuve à 125° pendant 3 heures.
- Laisser refroidir l'ampoule avant de l'ouvrir.
- L'hydrolysat, éventuellement, décoloré par agitation avec du charbon activé, est filtré.
  Dans le cas d'urines très colorées et résistantes à un traitement au charbon, il est possible de faire un blanc urine avec tous les réactifs sauf le pDAB.
- 5 ml de filtrat sont neutralisés par de la lessive de soude ou de potasse, diluée au demi, en présence de phénol-phtaléine, et transférés ensuite dans une fiole jaugée de 25 ml. On complète ensuite à 25 ml avec du tampon pH 6 (dilution finale de l'urine au 10e). Dans un deuxième temps, le taux de dilution de l'hydrolysat peut être modifié de manière à obtenir un échantillon à doser dont la concentration en HP est comprise entre

2 et 20 mg par litre. Le même hydrolysat peut être utilisé aussi bien pour la technique manuelle que pour la technique automatique.

c)- Technique manuelle

Le dosage sera conduit suivant le schéma de la figure 16

d)- Technique automatique

Le dosage de l'hydroxyproline peut être réalisé avantageusement en technique automatique. Nous reproduisons sur la figure 17 le schéma de montage pour l'Autoanalyseur TECHNICON, inspiré de celui proposé par GRANT(22). La cadence de dosage est de 60 échantillons à l'heure en intercalant un godet d'eau entre chaque prélèvement (urine ou étalon) : soit 30 dosages à l'heure.

Pour le dosage de l'hydroxyproline totale, il convient de tenir compte de la dilution effectuée après l'hydrolyse.

e)- Etalonnage

Avec la technique manuelle, la courbe d'étalonnage est une droite pour des taux d'hydroxyproline compris entre 0 et 20 mg par litre.(Fig. 18). En technique automatique, à partir de 10 mg, on constate un léger infléchissement de la courbe (Fig. 19).

Ces valeurs recouvrent largement la plupart des taux rencontrés dans l'urine (jusqu'à 20 mg pour l'HP libre et 200 mg pour l'HP totale. Des dilutions supplémentaires de l'échantillon ne sont utiles que pour des urines très concentrées en HP, ou, lorsqu'on analyse des fractions obtenues par chromatographie.

Eau distillée	BLANC	DOSAGE
	1 ml	
Hydrolysat dilué ou solution étalon d'hydroxyproline (réactif V)		1 ml
Chloramine T (réactif 1)	1 ml	1 ml
Agiter et laisser 20 minutes à la température du laboratoire		
Solution de sulfite de Na (réactif III)	1 ml	1 ml
Agiter et laisser 5 minutes à la température du laboratoire		
Solution de pDAB (réactif IV)	1 ml	1 ml

- Porter chaque tube au bain-marie à 60° pendant exactement 14 minutes, refroidir pendant 5 minutes dans un courant d'eau froide.

- Lecture après refroidissement à 560 nm contre le blanc.
- Etablir la courbe d'étalonnage pour chaque série de dosages. La coloration suit la loi de BEER LAMBERT pour des concentrations à 0 à 20 mg/litre.

FIGURE 16 : Technique manuelle ; protocole opératoire.

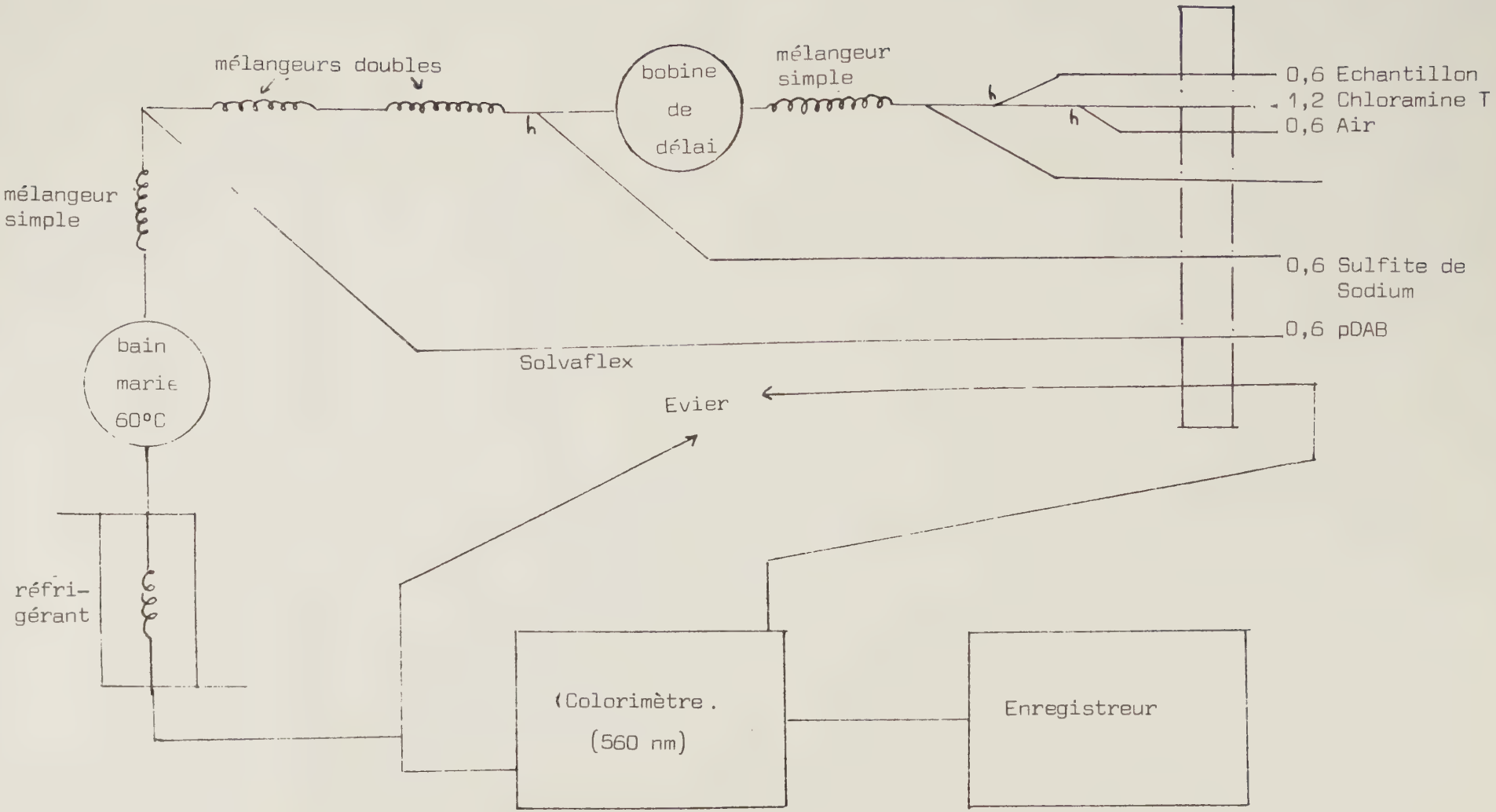


Fig. 17 - Schéma de montage pour dosage automatique de l'hydroxyproline dans l'urine

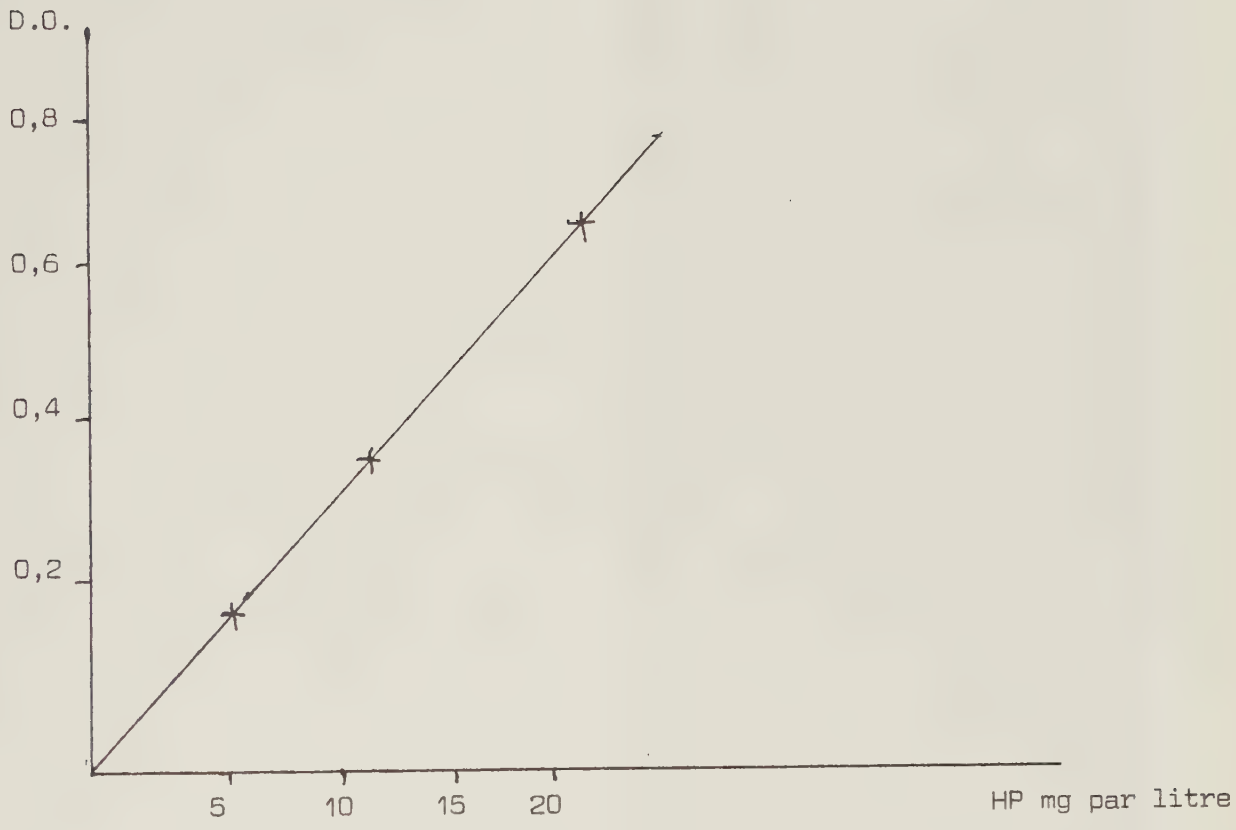


Fig. 18 - Courbe d'étalonnage (technique manuelle)

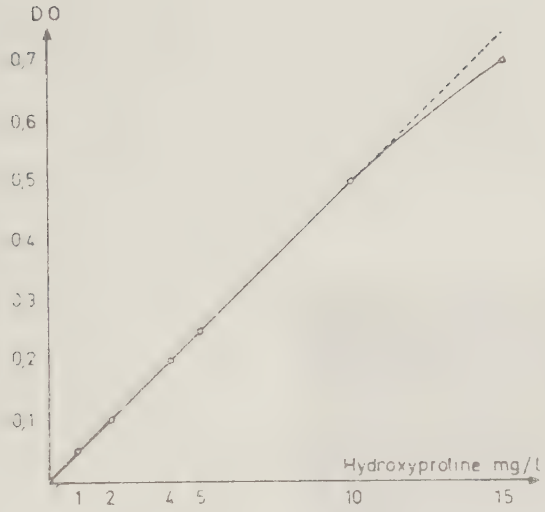


Fig. 19 - Courbe d'étalonnage (technique automatique)

f) - Reproductibilité

Le respect des temps exacts pour l'oxydation et la coloration est primordial pour une bonne reproductibilité des résultats, en ce sens la technique automatique donne de très bons résultats qu'illustre la figure 20.

Un essai de reproductibilité a été effectué sur une urine où le dosage de l'HP totale a été répété vingt fois de suite par la technique automatique.

La valeur moyenne obtenue est de 18 mg avec un écart type de 0,09 mg. Le coefficient de variation est ainsi de 0,5 %, ce qui nous paraît très acceptable.

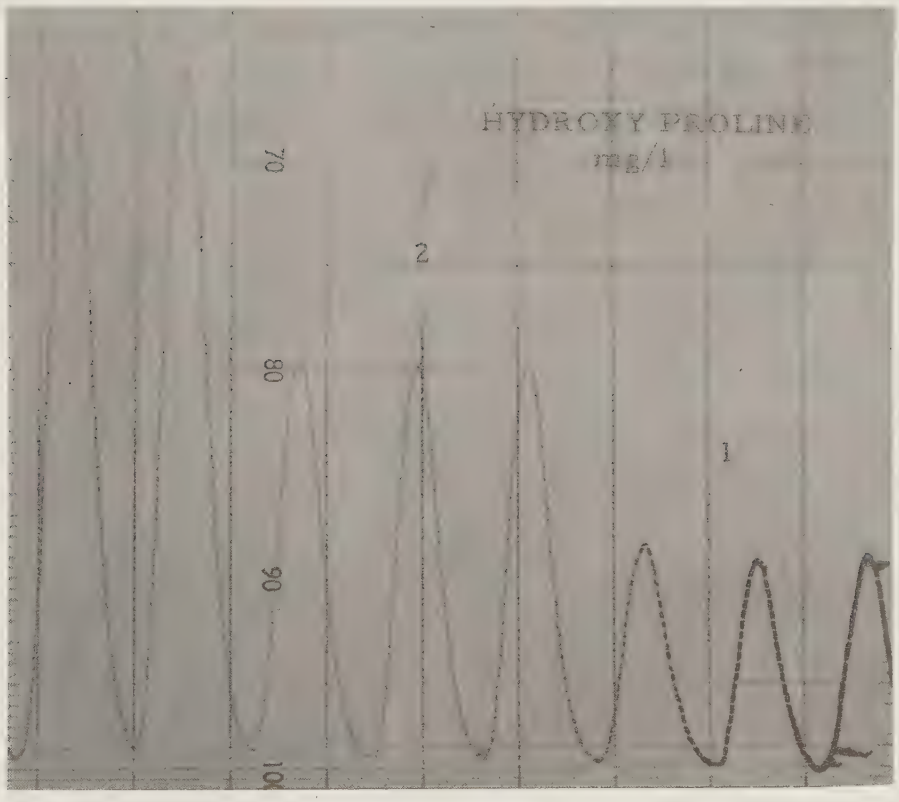


Fig. 20 - Reproductibilité des résultats

g) - Sensibilité

Dans les conditions opératoires décrites, la sensibilité obtenue pour le dosage de l'HP dans l'urine est satisfaisante puisque l'on obtient une densité optique de 0,05 pour 1 mg d'HP.

h) - Spécificité

L'inconvénient majeur du pDAB est de réagir avec de nombreux composés. Parmi ceux présents normalement dans l'urine, les dérivés indoliques et certains amino-acides aromatiques comme la tyrosine apparaissent certainement comme les plus gênants.

Dans le tableau VII, nous indiquons les modifications que peuvent apporter des surcharges en différents dérivés indoliques et en tyrosine sur le dosage de l'HP libre. Ces mêmes produits n'apportent pas de modifications dans le dosage de l'HP totale, du fait, probablement, de leur destruction par l'hydrolyse chlorydrique.

Composé	Elimination moyenne (en mg/jour)	Surcharge effectuée (en mg)	Surcharge obtenue (en mg)	
			HB libre	HP totale
Tryptophanne	40	100	2,5	0
Indoxyle sulfate	<100	100	0,2	0
Ac. Hydoxy-5 indol acétique	8	100	0,1	0
Tyrosine	50	100	1	0

Tableau VII : Valeur des surcharges apportées par des dérivés indoliques et la tyrosine.

Si les interférences restent faibles dans le dosage de l'HP libre, il faut cependant signaler que parfois les surcharges en HP donnent des résultats inconstants lorsqu'elles sont effectuées sur de l'urine pure, alors que les surcharges sur les urines subissant l'hydrolyse sont régulièrement retrouvées. Peut-être certains composés de l'urine consomment-ils une certaine quantité de chloramine ou inhibent partiellement la coloration.

En outre, des interférences fortuites, surtout sur l'HP libre, peuvent être provoquées par certains métabolites médicamenteux, aussi il est recommandé d'interrompre toute thérapeutique 48 heures avant le prélèvement des urines.

Certains auteurs signalent que la concentration sels et en particulier en NaCl peut modifier la réaction colorée avec le pDAB. Nous avons surchargé des urines, avant de les soumettre à l'hydrolyse, avec des solutions de NaCl correspondant à des surcharges finales de 3, 4, 5, 6, 7 g/l. Ces taux élevés en sels n'apportent aucune modification de l'intensité de la coloration dans les conditions opératoires précédemment décrites.

L'urée serait également capable pour certains de modifier les résultats des dosages.

Pour vérifier cette remarque, nous avons hydrolysé et dosé des urines, avant et après action de l'uréase ; les résultats trouvés dans les deux cas sont tout à fait comparables.

En conclusion, on peut dire que, si les interférences sont faibles dans le dosage de l'HP totale, du fait des conditions d'hydrolyse très brutales, il n'en est pas de même pour le dosage de l'HP libre. On devra donc effectuer ces deux dosages en même temps pour comparer les deux résultats.

E - Isolement des peptides contenant de l'hydroxyproline

Dans le premier chapitre, nous avons décrit les différents hypropeptides que l'on peut rencontrer dans l'urine, en donnant

les résultats obtenus par MEILMAN et ses collaborateurs (51).

Le principe de la technique adoptée par MEILMAN est le suivant :

Désionisation des urines par passage sur résine échangeuse d'ions ; concentration, puis chromatographie sur résines DOWEX 50 W en phase acétique ; élution par l'acide acétique 0,1 N avec des quantités croissantes d'acétate de potassium et recueil de l'éluat en différentes fractions sur lesquelles sont dosés : hypropeptides, HP totale et HP libre. Les acides aminés de chaque fraction sont ensuite séparés et caractérisés par chromatographie sur plaque.

Grâce à cette technique, les auteurs ont isolé les 6 fractions précédemment envisagées sur les urines d'une vingtaine de sujets sains et malades.

Sur l'urine de six femmes, post partum, ils n'obtiennent que peu de modifications pour deux d'entre elles, et sur les quatre autres des différences assez variables.

Chez les sujets atteints de maladie de Morphée, ils constatent la disparition du deuxième pic correspondant au tripeptide acide glutamique - hydroxyproline - acide glutamique sans autre changement notable.

Dans les maladies du collagène, des modifications sont observées, mais, ici encore, elles varient suivant les sujets.

BOREL et JAYLE (8) ont également réalisé un fractionnement des hypropeptides sur une résine DOWEX en phase alcaline. L'urine neutralisée est passée sur la colonne puis on effectue l'élution par de la soude N qui libère de la colonne l'HP libre et les peptides "acides" qui s'y trouvaient fixés, les peptides "basiques" étant déterminés par différence entre l'HP totale et les fractions précédemment recueillies.

Chez le sujet normal, la fraction HP libre et les peptides acides représentent 50 % du total. Dans les cancers avec métas-

tase, la fraction des hypropeptides "basiques" est nettement et constamment augmentée. Par contre, dans d'autres cas pathologiques, en particulier l'ostéoporose, la maladie de Paget et l'hyperparathyroïdie, ce sont les hypropeptides "acides" qui sont les plus élevés.

HANSON et WIEDERANDERS (23) ont également mis au point une séparation des hypropeptides sur Séphadex. Les peptides sont concentrés par évaporation sous vide à basse température. Puis on réalise une chromatographie sur Séphadex G 25, précédée ou non, d'une purification par passage sur Séphadex G 50.

Les auteurs obtiennent ainsi une séparation des hypropeptides en deux fractions :

- Fraction 1 (environ 20 % du total) formée de peptides à poids moléculaire élevé.
- Fraction 11 (80 % du total) composée de peptides à faible poids moléculaire.

Lors de nos essais, nous avions utilisé du Séphadex G 25, et nous avons pu observer ces deux fractions dans des proportions comparables.

Les auteurs ont réalisé cette séparation chez différents sujets sains, adultes et enfants des deux sexes, et chez des malades atteints de lathyrismes ou de cancers avec métastases, mais ils n'ont pas observé de différences notables dans l'un de ces différents groupes.

Nous avons essayé pour notre part de séparer les hypropeptides urinaires par chromatographie d'exclusion. Le principe de la technique adoptée est le suivant :

- Fixation des peptides sur résine échangeuse d'ions.
- Après élution, chromatographie sur Séphadex G 10, puis hydrolyse des fractions de l'éluat et dosage de l'HP dans les différentes fractions.

1 - Matériel et Réactifs

Résine échangeuse d'ions. DOWEX 50 x 8 (20 à 50 mesh) sous forme acide, environ 500 ml.

- Séphadex G 10 - 150 g
- NH_4 OH - 1 N
- CH_3 CO_2 H - 0,1 N
- colonne 1,5 cm - longueur 25 cm

2 - Préparation des urines

Les urines de 24 h. prélevées sur toluène ou HCL sont ajustées à pH 2 puis filtrées.

Passage sur résines DOWEX 50 x 8 sous forme acide dans une colonne de 50 à 60 mm de diamètre ; lavage de la colonne avec 3 litres d'eau distillée, puis élution par NH_4 OH N (3 litres).

Concentration de l'éluat par évaporation sous vide à basse température ($< 50°$). Conserver une nuit au dessicateur sous vide, puis reprendre par 50 ml d'eau distillée.

Faire alors un dépôt d'environ 2 ml sur la colonne de Séphadex et éluer par CH_3 CO_2H, 0,1 N pendant 24 heures.

Recueillir des fractions de 3 ml à raison de trois fractions à l'heure.

Les fractions seront ensuite soumises à l'hydrolyse chlorydrique (voir plus haut) puis on effectuera un dosage d'HP par la technique automatique précédemment décrite.

3 - Résultats

Par ce procédé, nous avons pu séparer trois fractions (Fig. 21).

- La première, dont le maximum correspond au 30e tube représente environ 10 % du total.
- La seconde, dont le maximum est à la 40e fraction, couvre 75 % du total.
- Le troisième pic au niveau de la 50e fraction correspond à 15 % de l'HP totale.

Pour l'origine de ces fractions, nous supposons

1 - Que le 1er pic contient des peptides de poids moléculaire élevé (tripeptides élués les premiers).

2 - Le 2e pic renfermerait le dipeptide proline hydroxyproline, principal hypropeptide urinaire, et également l'HP libre, comme nous l'avons vérifié en surchargeant une urine ayant déjà subi une chromatographie.

3 - Le 3e pic semble correspondre à un peptide adsorbé en partie, sur la colonne.

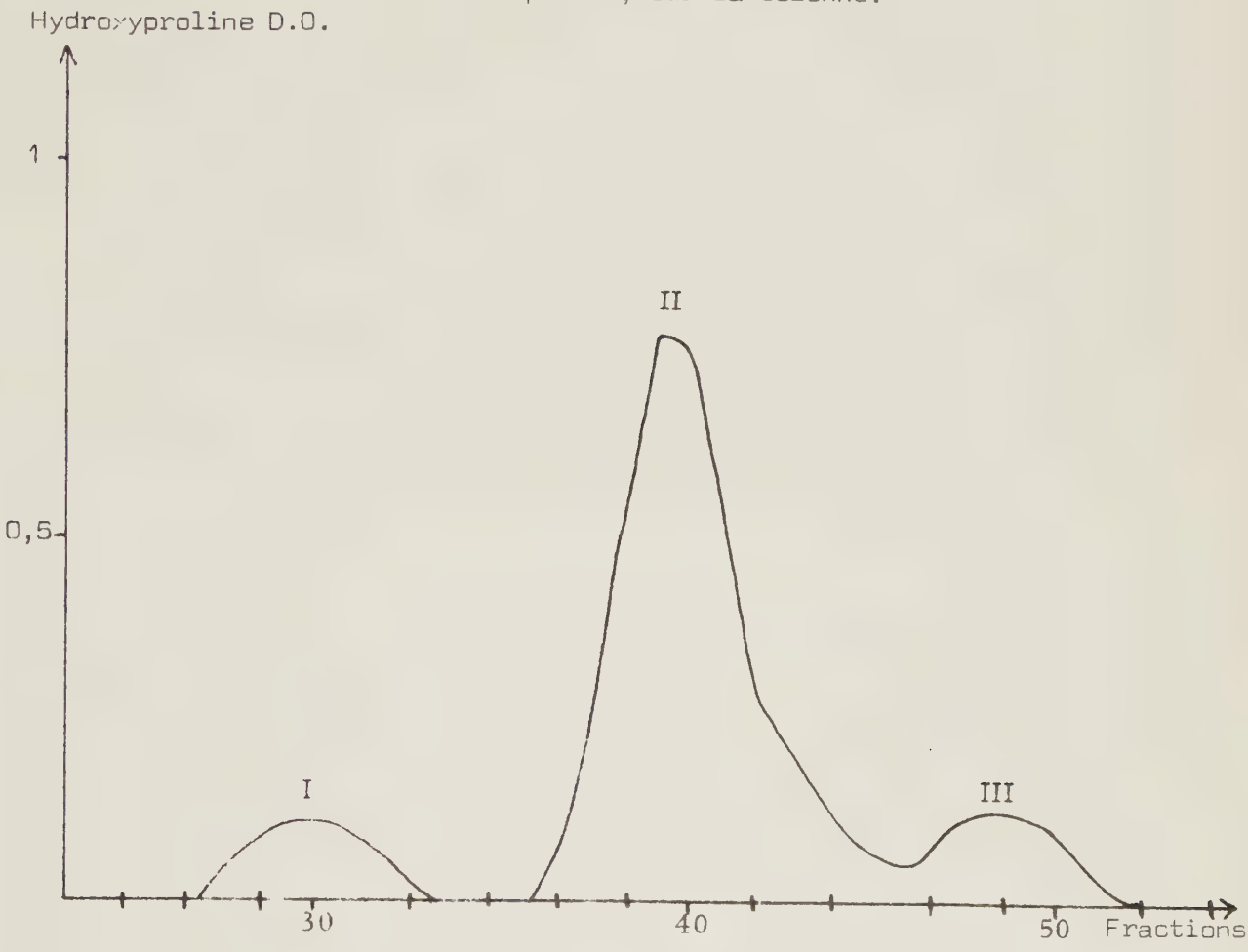


Fig. 21 - Séparation des hypropeptides sur colonne de SEPHADEX G 10 (adulte normal)

Nous avons traité de la même manière les urines d'un malade atteint de maladie de Paget et de deux malades ayant des cancers avec des métastases osseuses.

Le tableau VIII donne les valeurs trouvées en regard des normales établies chez des sujets sains.

	HP totale mg/jour	HP libre mg/jour	Fr.I %	Fr. II %	Fr. III %
Normales chez l'adulte (moyennes)	25	1,6	10	75	15
(AN...) Paget	253	2	2	57	41
(MA ...) Cancer métastases osseuses	252	3,5	12,5	70	17,5
(LA...) Cancer métastases osseuses	112	3	13,5	53	33,5

TABLEAU VIII : Pourcentage des fractions obtenues sur Séphadex dans quelques cas pathologiques.

Sans vouloir tirer des conclusions hâtives de ces résultats, il convient de les rapprocher de l'observation de certains auteurs (11) ayant isolé des peptides de fort poids moléculaire, dans la maladie de Paget et les cancers osseux. Le troisième pic, isolé, dont la concentration augmente au cours de ces affections, pourrait renfermer ces hypropeptides de grande taille. Cette étude, intéressante en biologie chimique, doit être poursuivie dans plusieurs directions :

- Séparation plus poussée des fractions (en jouant sur le débit et la longueur de la colonne).
- Analyse de la composition en acides aminés des différents pics en établissant le rapport

$$\frac{HP}{\text{Amino-Acides-totaux}}$$

Modifications dans d'autres cas pathologiques

CHAPITRE III

VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DE L'HP URINAIRE.

Nous avons vu au premier chapitre les relations étroites existant entre le métabolisme du collagène et l'HP présente dans les liquides de l'organisme, aussi nous a-t-il paru intéressant de rechercher ses variations dans diverses affections.

La majorité des travaux publiés concernent le dosage de l'HP dans l'urine. Nous envisagerons donc successivement, en comparant nos résultats à ceux déjà rapportés dans la littérature, les taux normaux de l'hydroxyproline, ses variations physiologiques (sexe, âge et régime alimentaire) et pathologiques.

1 - VALEURS NORMALES DE L'HP URINAIRE CHEZ L'ADULTE

Nous regroupons dans le tableau IX les résultats obtenus par différents auteurs.

Notre technique automatique précédemment décrite nous a donné les résultats suivants :

Sur 634 cas normaux, nous obtenons

Pour l'HP totale

- une valeur moyenne de 25 mg par 24 heures
- un écart type de 8 mg
- des limites acceptables de 25 $\pm$ 16 mg/24 h.
  (95 % de la population examinée, probabilité 0,05)

Pour l'HP libre

- une valeur moyenne de 2,00 mg par 24 h.
- un écart type de 0,7 mg
- des limites acceptables de 2 $\pm$ 1,4 mg/24 h.
  (95 % de la population examinée, probabilité 0,05).

Nous notons ainsi que les valeurs "normales" sont assez dispersées ; nous tenterons plus loin d'expliciter ce fait.

Auteurs	Technique employée	Nombre de cas normaux	HP totale mg/24 H.	HP libre mg/24 H.
rockop et Udenfriend (71)	id	?	15 - 62	0,5 - 1,2
rockop et Sjoerdsma (70)	id	?	24 (16-34)	0,3 - 1,2
eroy (43)	moyenne de plusieurs auteurs	524 42 20	28 (9-70) 18 ± 6 mg/m2/24 h. 19 ± 5 µg/ mg de créa.	
ull (12)	id	?	39-44	< 4 % HP tot.
itona (53)	id	12	25 (14-39)	0,65 (0,2 - 2,1)
iff (85)	id	?	23	0,55
orel (78)	id	25	27 ± 4 (23 - 31)	2 ± 1 (0,3 - 8)
ubovsky (11)	Prockop et Udenfriend	8	18,6 µg/mg de créat.	0,2 µg/mg de créat.
alima (31)	Kivirikko (35) (36)	?	8,5 - 23,5 mg/m2/24 h.	1,5 à 4,7 % HP totale
ioco (27)	Prockop et Udenfriend "	30 21	25±5 (15-35 15,3±4, 8 mg/m2/24h	
reux et Leymarie (10)	T. automatique	634	25 ± 16	2 ± 1,4

TABLEAU IX - Valeurs normales, chez l'adulte, de l'hydroxyproline selon différents auteurs (entre parenthèses : valeurs extrêmes).

11 - VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES

Un certain nombre de variables peuvent influer sur l'excrétion de l'hydroxyproline.

A - Variations avec le sexe

Plusieurs auteurs signalent une excrétion d'hydroxyproline supérieure chez l'homme (11) (5) (35). LEROY a aussi relevé des valeurs légèrement différentes dans les deux sexes.

Hommes (49 cas) 33 mg par 24 h. (17-59)

Femmes (37 cas) 27 mg par 24 h. (11-50)

Mais si l'on corrige les résultats en fonction de la surface corporelle ou de l'excrétion de la créatinine, les valeurs diffèrent assez peu suivant le sexe (1) (2) :

Hommes (83 cas) 17 mg/m^2/24 h.

Femmes (65 cas) 16 mg/m^2/24 h.

Hommes (13 cas) 25 µg/mg créatinine

Femmes (6 cas) 28 µg/mg créatinine

On peut donc penser que la différence d'excrétion chez l'homme et chez la femme dépendent du volume de collagène existant.

Nous avons repris cette étude sur un nombre plus important de cas. Chez les hommes, notre moyenne se situe aux alentours de 25,30 mg par 24 heures (moyenne établie sur 200 cas) tandis que chez les femmes, elle est de 24,4 mg par 24 heures (moyenne établie sur 250 cas).

Si l'on trace les courbes de répartition des résultats chez les hommes et les femmes pour l'HP totale (Fig. 22) et l'HP libre (Fig. 23), il semble que la majorité des chiffres correspondant à la population masculine soient rassemblés dans les valeurs les plus élevées, alors que la population féminine se situe plutôt dans les valeurs basses.

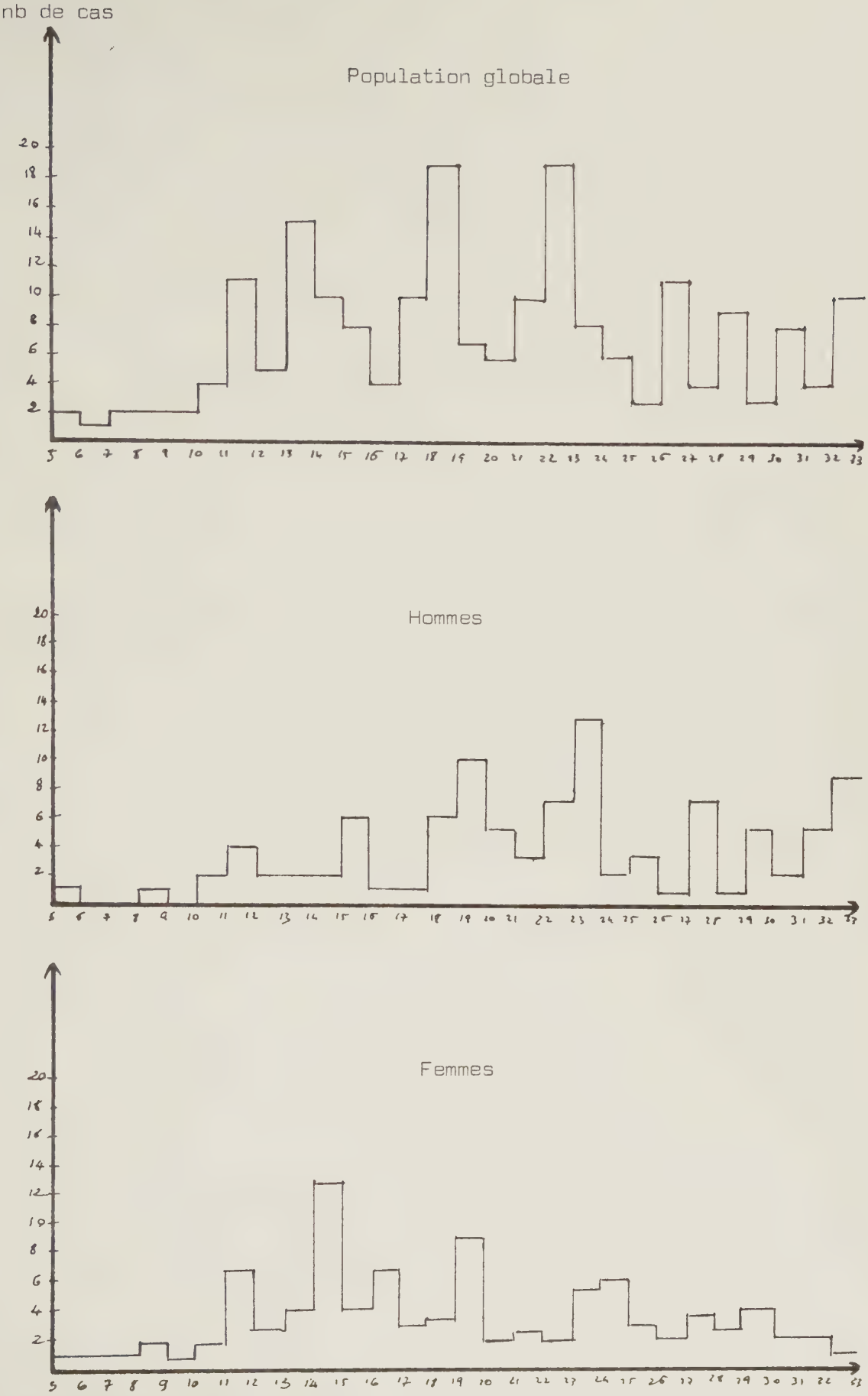
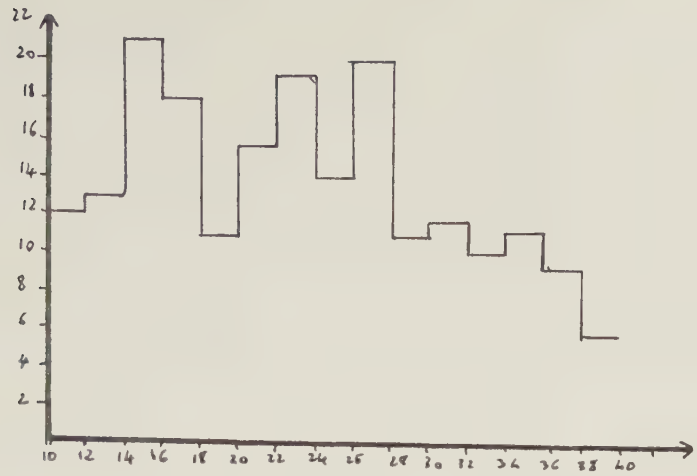
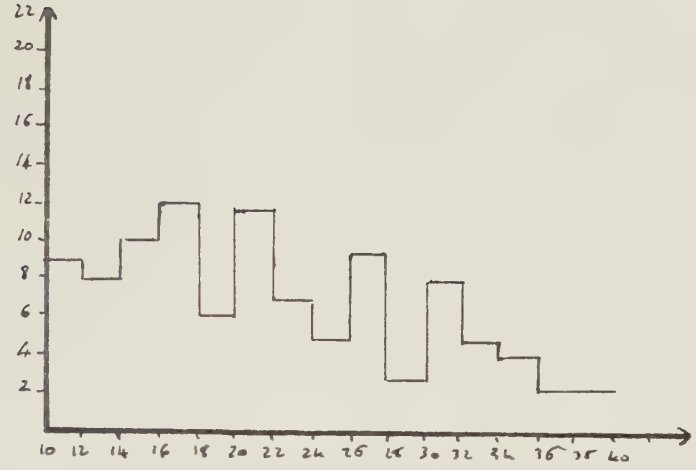


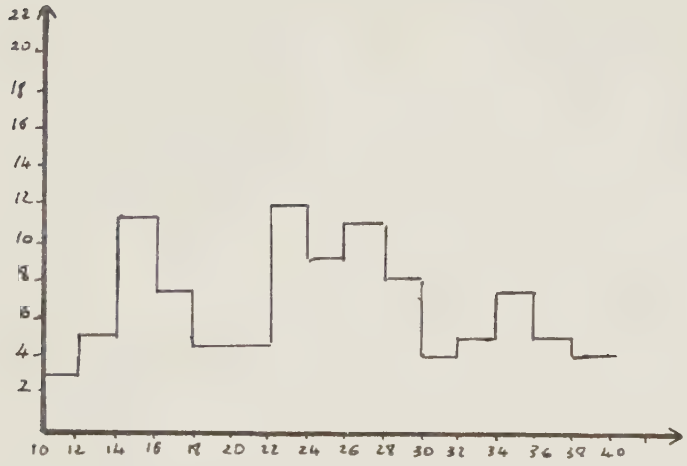
Fig. 22 - Courbe de répartition des taux journaliers d'HP totale éliminée dans l'urine chez des individus sai



Population globale



FEMMES



HOMMES

Fig. 23 - Courbe de répartition des taux journaliers d'HP libre éliminés dans l'urine chez des individus sains

En effet, dans la population féminine, nous trouvons que 65 % des individus ont des taux d'HP totale compris entre 10 et 25 mg par 24 heures (Tab. X)

Chez les hommes par contre 43 % des individus sont dans la zone comprise entre 10 et 25 mg alors que 57 % se placent entre 25 et 40 mg (Tab. X)

	HP totale		HP libre	
	10 à 25 mg/24 h.	25 à 40 mg/24 h.	1,2 à 22 mg/24 h.	2,2 à 3,2 mg/24 h.
Femmes	65 %	35 %	61 %	39 %
Hommes	43 %	57 %	43 %	57 %

Tableau X

Pour l'hydroxyproline libre nous retrouvons sensiblement cette répartition. Chez les femmes, 61 % ont des résultats compris entre 1,2 et 2,2 mg par 24 heures. Chez les hommes, il y a 43 % des valeurs entre 1,2 et 2,2 mg et 57 % entre 2,2 et 3,2 mg par 24 heures. Pour nous, il existe donc une légère différence d'excrétion journalière de l'hydroxyproline entre l'homme et la femme, assez faible cependant pour que nous puissions considérer une seule population normale.

B - Variations avec l'âge

De nombreux auteurs ont décrit des différences de l'excrétion de l'HP urinaire en fonction de l'âge.

ALLISON (1) exprimant ses résultats en mg par mg de créatinine décrit l'augmentation d'excrétion urinaire entre 0 et 1 mois,

puis une diminution entre 6 mois et 5 ans. On constate ensuite des valeurs constantes jusqu'à 20 ans. L'augmentation post-natale serait due à une augmentation de la croissance par rapport à la période prénatale. Il faut signaler que la valeur du rapport $\frac{\text{HP libre}}{\text{HP totale}}$ est toujours plus élevée chez l'enfant que chez l'adulte.

SALEH (74) exprimant ses résultats en mg par 24 h., apporte des conclusions légèrement différentes. Il insiste surtout sur l'élévation de l'élimination urinaire entre 10 et 20 ans en rapport avec la croissance. A l'inverse, il observe une baisse entre 70 et 90 ans, caractéristique d'une baisse de l'activité métabolique de l'os, un faible turn-over du collagène insoluble et une diminution de la synthèse du collagène insoluble ; les valeurs moyennes sont alors de 16 à 19 mg par 24 heures contre 27 mg entre 30 et 70 ans.

LEROY (43) donne les renseignements les plus précis pour la période allant de 0 à 25 ans.

De 0 à 1 an

La moyenne se situe à 33 mg par 24 heures, valeurs extrêmes 19 et 61, soit 105 mg/m2/24 heures (40 et 190), la moyenne des six premiers mois (85) est d'ailleurs plus élevée que pour les six suivants. La signification de ces chiffres élevés est encore mal expliquée, il s'agirait peut-être d'une insuffisance de maturation du système enzymatique de dégradation de l'HP libre. Rappelons que celle-ci est beaucoup plus élevée que chez l'adulte (jusqu'à 45 % du total)

De 1 à 10 ans

La moyenne s'établit à 67 mg par 24 heures (valeurs extrêmes 15 - 210) soit 64 mg par m2/24 heures (40 à 120). Il faut noter pour cette période de très grosses variations d'un individu à l'autre, dues sans doute aux variations de la croissance.

En outre, l'âge de la puberté influe également et explique peut-être la différence de moyennes entre les jeunes filles (71 mg/m2/24 heures) et les jeunes garçons (60 mg/m2/24 heures).

De 11 à 16 ans

On observe les plus forts taux d'élimination par jour, 143 mg en moyenne, avec des valeurs extrêmes de 45 à 700 dues probablement à la croissance intense caractéristique de cette période.

L'élimination par m2 et par 24 heures avoisine 72 mg. ENDERSON (2) a trouvé des valeurs plus élevées chez le jeune homme (64 mg/m2/24 heures) que chez la jeune fille (28 mg/m2/24 heures).

De 17 à 24 ans

La moyenne des dosages est de 50 mg par 24 heures (31-120). On note alors une diminution progressive de l'élimination variable selon les individus. Il est encore possible entre 20 et 23 ans de trouver des valeurs de 80 à 100 mg par 24 heures.

Au-delà de 24 ans

Les taux normaux, comme nous l'avons indiqué plus haut, sont de l'ordre de 25 mg par 24 heures. Avec un régime normal, on ne dépasse normalement 60 mg par 24 heures et 40 à 50 mg avec un régime végétarien.

Malgré le nombre de dosages que nous avons effectués, nous ne possédons que peu de données sur les valeurs normales chez les enfants en bas âge ; nous avons pu cependant observer leur grande disparité et l'élévation du pourcentage de la fraction libre.

Pour les adolescents entre 15 et 23 ans, nous avons une moyenne voisine de celle indiquée par LEROY de 58 mg par 24 heures.

Les valeurs normales chez l'adulte ont été décrites plus haut.

Pour le vieillard, nous décelons également une nette diminution de la moyenne, que nous avons établie sur 18 sujets sains de plus de soixante ans, aux environs de 17,5 mg par 24 heures.

Nous présentons dans la figure 24 les variations de l'hydroxyproline urinaire en fonction de l'âge et du mode d'expression des résultats. (Fig. 24)

On remarque que ces variations sont différentes en fonction de la présentation des résultats. Il apparaît ainsi qu'en exprimant en mg/ d'HP par 24 heures, on révèle mieux l'importance du métabolisme du collagène correspondant aux périodes d'activité intenses ou ralenties de la croissance osseuse.

C - Variations avec le régime alimentaire

Cette question est importante, car elle conditionne l'interprétation des résultats des dosages de l'hydroxyproline.

Il semble bien, en effet, qu'un régime comportant des quantités notables de collagène et de gélatine augmente l'hydroxyproline urinaire (75) ; ce fait expliquerait la dispersion des valeurs normales que nous avons constaté. Il est possible également que l'on puisse rapporter à cette cause l'observation d'une population normale dédoublée, aussi bien chez les hommes que chez les femmes, mais avec une inversion du rapport entre les deux sous groupes. Le taux d'élimination journalière sera donc plus constant, si l'on supprime de l'alimentation les sources importantes de gélatine ou de collagène : viande, gelées, glace, confiture ...

GERBER (21) indique des valeurs moyennes de 43 mg/24 h avec une diète légère (suppression des gelées et glaces) et 31 mg/24 h avec une diète sévère (suppression des viandes). Cette différence, de l'ordre de 12 mg, correspond à celle que nous avons observée entre les moyennes des deux sous populations (10 mg).

Il est à noter que l'absorption d'hydroxyproline pure n'augmente que la fraction libre de l'urine sans modifier la partie

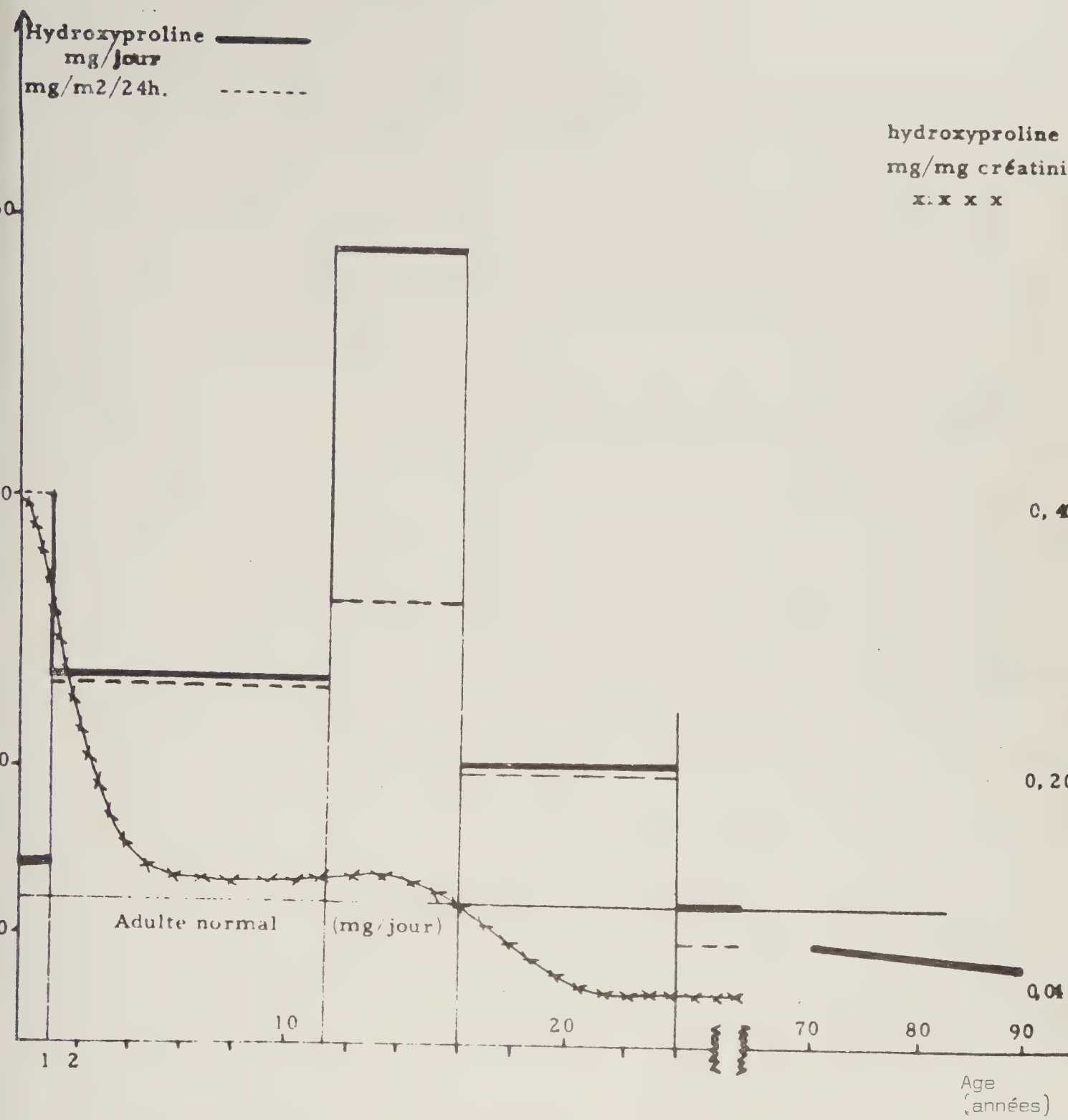


Fig. 24 - Variation de l'hydroxyprolinurie en fonction de l'âge (moyennes d'après plusieurs auteurs). (1) (2) (43) (74) (85)

combinée sous forme de peptides, ce qui constitue une des preuves du métabolisme de l'HP et de l'origine des peptides urinaires (70) (85).

Par contre, l'ingestion de gélatine provoque une augmentation plasmatique et urinaire des hypropeptides qui risque de masquer une éventuelle décharge pathologique des peptides provenant du collagène de l'organisme. Il faudra donc tenir compte de ces données diététiques pour une exploration précise du métabolisme du collagène.

D - Variations de l'élimination au cours du Nyctemere

MAUTALEN (54) a étudié l'excrétion de l'HP au cours de la journée sur un groupe de 12 femmes et de 4 hommes.

L'excrétion de l'HP totale suit un rythme circadien, reproductible, avec le maximum d'excrétion de minuit à huit heures et le minimum de douze heures à vingt heures (Fig. 25). Ce fait pourrait, d'après l'auteur, correspondre à l'augmentation de la résorption osseuse qui aurait lieu durant la nuit, période de jeûne et de repos, plus que pendant le jour. L'HP libre possèderait, par contre, un cycle journalier contraire à celui de l'HP totale, suggérant l'hypothèse que des facteurs différant de la résorption osseuse influenceraient son excrétion.

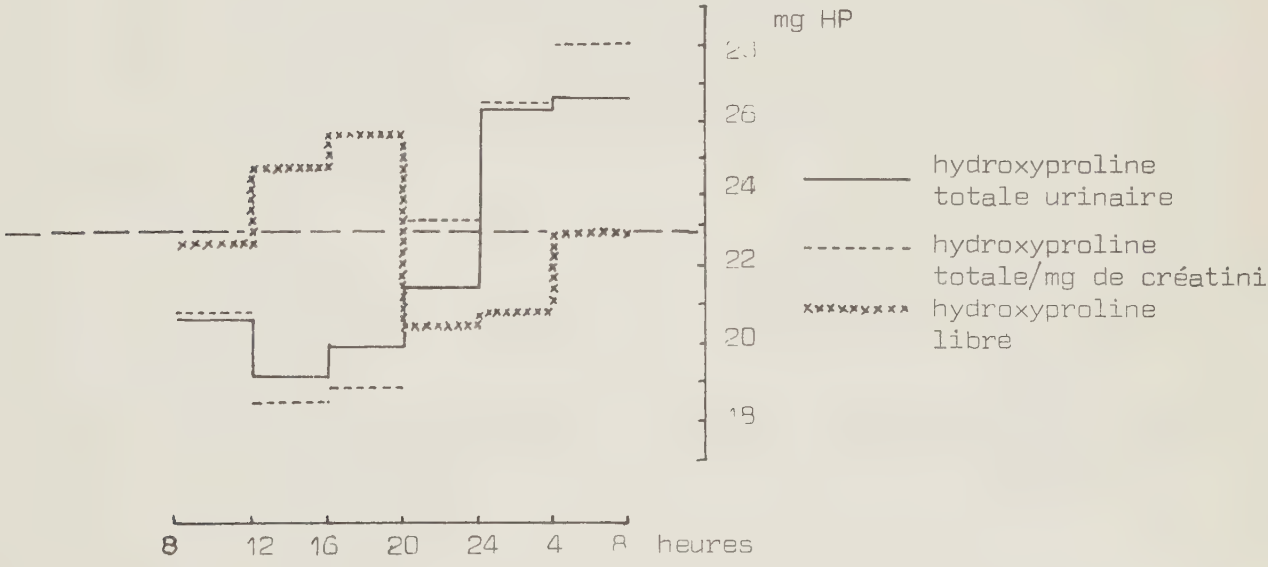


Fig. 25 - Excrétion de l'hydroxyproline toutes les 4 heures (d'après MAUTALEN)

Nous avons tenté de confirmer ces résultats en dosant l'HP totale et libre sur des urines recueillies en différentes fractions pendant 24 heures.

La figure 22 représente les résultats obtenus pour le dosage de l'HP totale des urines de quatre sujets sains. Dans cette expérience, nos résultats ne montrent pas de cycles d'excrétion reproductible présentant une augmentation nocturne.

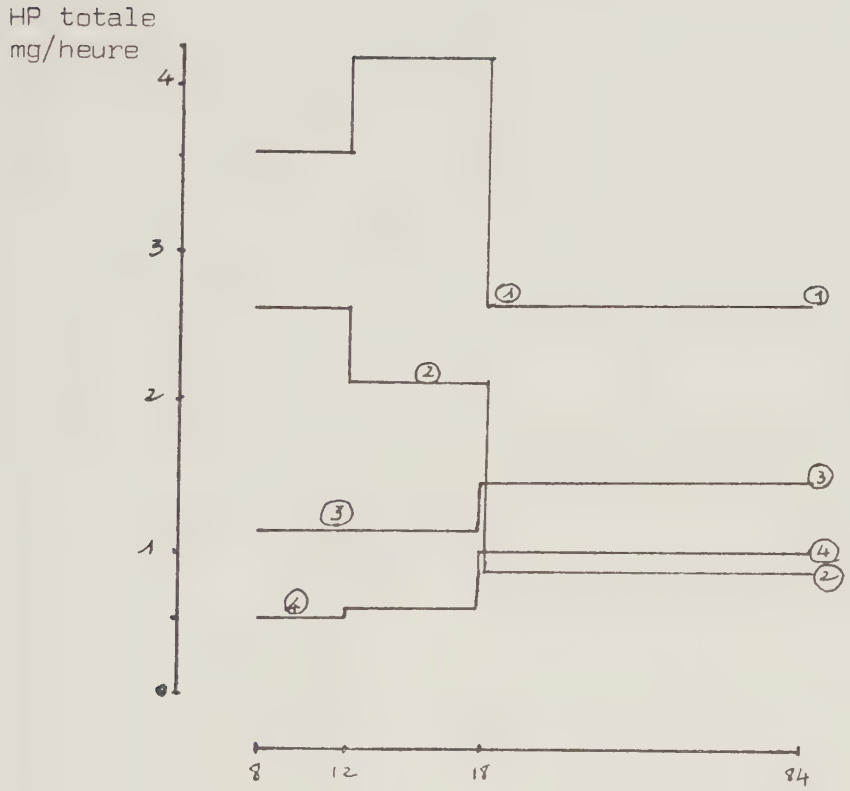


Fig. 26 - Excrétion de l'HP totale exprimée en mg par heure chez quatre sujets dont les urines sont recueillies en trois fractions

Pour l'hydroxyproline libre (Fig. 23) nous trouvons, à l'inverse de MAUTALEN, une excrétion horaire légèrement augmentée pendant la nuit.

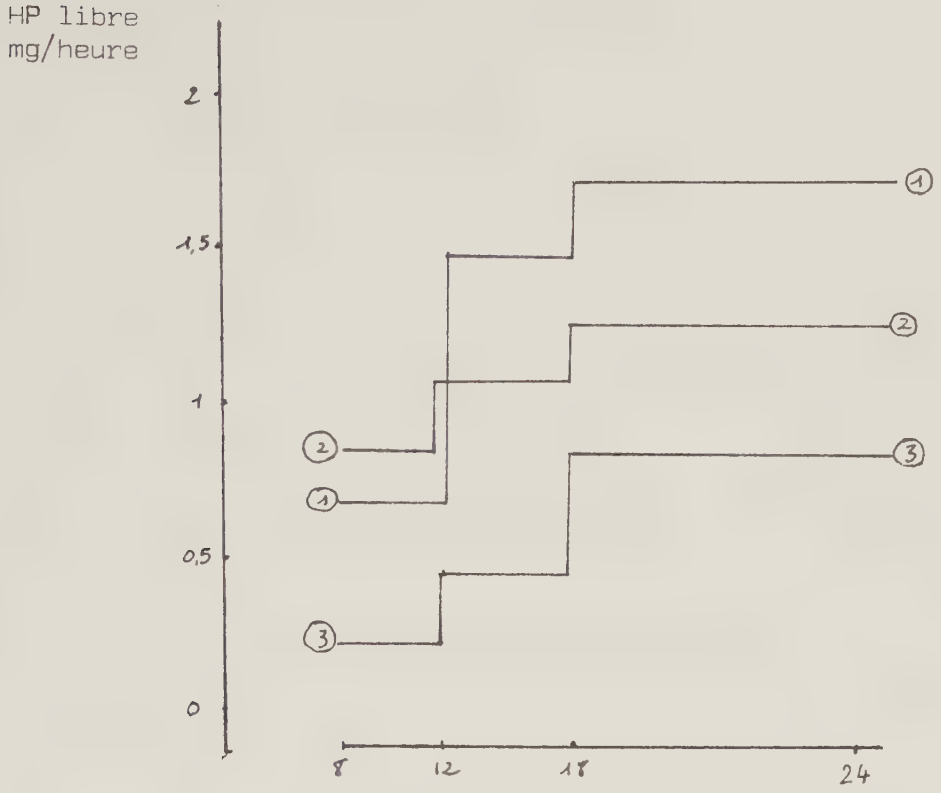


Fig. 27 - Excrétion de l'HP libre exprimée en mg par heure chez trois sujets dont les urines de 24 heures sont recueillies en trois fractions.

E - Influences hormonales

Les effets décrits ont été observés à la suite d'expérimentations ou de traitements hormonaux.

Oestriol et Oestradiol diminuent l'excrétion urinaire de l'HP (32). Cette propriété a été appliquée au traitement du cancer de la prostate ou des maladies de Paget. La testostérone aurait le même effet. Ces hormones pourraient agir en augmentant la formation

de collagène insoluble ou en diminuant la vitesse de son métabolisme.

Les hormones thyroïdiennes ou para-thyroïdiennes provoquent une augmentation rapide de l'hydroxyproline urinaire.

L'hormone ganadotrope favorise la croissance et doit, de ce fait, augmenter l'élimination urinaire de l'HP. Pour JASIN (30) cette action est faible et lente. Pour d'autres auteurs, par contre, ces résultats sont plus nets (37).

A des taux modérés, les corticoïdes semblent peu modifier l'élimination de l'hydroxyproline. Par contre, à des doses plus fortes, on observe une baisse de l'hydroxyproline, ce que nous avons pu vérifier plusieurs fois après traitement à la Prédnisone.

Enfin, l'action de l'Adrénaline et de la Nor-Ardenaline semble inexistante, puisque chez une malade atteinte d'un phéochromocytome et sécrétant de fortes quantités de catécholamines, l'élimination trouvée était normale (19 mg/24 h.).

III - VARIATIONS PATHOLOGIQUES

L'hydroxyproline se trouvant essentiellement localisée dans le collagène, constituant organique principal de l'os, ses variations dans les différents tissus et liquides de l'organisme seront particulièrement utiles pour l'étude des modifications osseuses, physiologiques ou pathologiques. En plus, le collagène osseux a une activité métabolique plus élevée que celui du tissu conjonctif (21).

Ainsi, comme nous allons le voir, ce sont surtout dans les affections osseuses que le métabolisme de l'HP est le plus perturbé. Nous y ajoutons également les troubles de la croissance et les affections para-thyroïdiennes. Plus récemment, on s'est intéressé aux maladies du collagène.

Dans l'énumération de ces différents syndromes, nous indiquerons nos propres résultats, comparés à ceux rapportés par les différents auteurs. Nous grouperons ensemble les malades dont le diagnostic a déjà été établi de manière sûre, et quelques cas où le diagnostic est simplement suspecté. De ce fait, nos valeurs moyennes

peuvent se trouver légèrement abaissées par rapport à d'autres auteurs et nous ne donnerons pas ainsi de valeurs extrêmes inférieures.

A - Maladies osseuses

D'une manière générale, il semble que la résorption osseuse libère des hypropeptides qui ne seront pas resynthétisés en collagène, mais éliminés dans l'urine ou catabolisés, la fraction retrouvée dans les urines représentant de trois à dix pour cent du collagène osseux détruit. L'élimination urinaire serait d'ailleurs liée à la résorption osseuse.

A la lueur de ces quelques données, nous allons passer en revue les principales affections osseuses dans lesquelles l'hydroxyprolinurie peut être modifiée :

1° - Ostéoporose

Le dosage de l'HP urinaire y est généralement peu modifié. HIOCO (27) donne une moyenne d'élimination de 35 mg $\pm$ 10 chez 31 malades présentant une ostéoporose idiopathique et 27 mg $\pm$ 10 chez 20 malades présentant une ostéoporose commune.

Ces chiffres sont voisins de la normale, cependant des chiffres plus élevés sont relevés dans les formes les plus évolutives. Mais il n'existe pas de relation entre l'importance radiologique de l'ostéoporose et le taux de l'HP urinaire. Il semble bien que l'hydroxyprolinurie soit davantage en relation avec le degré évolutif de l'ostéoporose qu'avec l'intensité des lésions.

Ces résultats ont été confirmés par d'autres auteurs. Ainsi LEROY (41) (57) a relevé sur une statistique de 45 cas d'ostéoporose une moyenne de 31 mg/24 h.

Nous avons étudié 28 cas d'ostéoporose confirmée pour lesquels nous trouvons des valeurs d'HP urinaire normales, avec une moyenne de 20,5 mg/24 h. pour l'HP totale et de 2 mg/24 h. pour l'HP libre. Ces valeurs sont un peu faibles, mais il faut signaler que la population était particulièrement âgée avec une moyenne d'âge de 65 ans.

Chez un enfant atteint d'une ostéogénèse imparfaite avec fractures multiples au cours de la vie, nous avons pratiqué des dosages d'hydroxyproline au cours de l'essai d'un traitement destiné à favoriser la consolidation de la dernière fracture.

Successivement puis simultanément, ont été administrés de la vitamine C, un anabolisant stéroïdique (Anatrophil*), puis du lactate de calcium. Au fur et à mesure de l'apport de ces différents médicaments, on a observé une augmentation progressive et constante de l'hydroxyproline urinaire, paraissant correspondre à une régénération osseuse plus intense.

2°- Ostéomalacie

Contrairement à l'ostéoporose, le taux d'HP urinaire est ici supérieur à la normale dans la moitié des cas. En outre, l'administration de calciferol élève toujours l'élimination urinaire, ce qui permet de suspecter une hyper-activité parathyroïdienne dans certaines ostéomalacies, notamment de carence.

Ce n'est que lorsque l'ostéomalacie est guérie que l'HP revient à un taux normal. Nous avons observé trois sujets atteints d'ostéomalacie avec des éliminations urinaires de 30, 36, et 60 mg d'HP totale par 24 heures.

3° - Maladie de Paget

Dans cette maladie, caractérisée par une importante résorption osseuse, les taux de l'HP urinaire sont très élevés et en rapport avec l'intensité de l'ostéolyse.

HIOCO donne des valeurs moyennes de 305 mg $\pm$ 210/24 h. dans les atteintes les plus sévères. LEROY indique 202 mg/24 h. sur une statistique de 62 cas.

Nous avons nous-mêmes constaté des valeurs toujours augmentées (60 à 390 mg/24 h.) chez 22 sujets dont la plupart portaient un diagnostic sûr de PAGET ; nous obtenons ainsi une élimination moyenne de 109 mg/24 h. Les taux d'HP libre sont en gé-

néral peu modifiés, sauf lorsque l'HP totale dépasse 200 mg par 24 heures.

Comme l'hydroxyprolinurie, la calciurie est plus élevée dans les périodes ostéolytiques, alors que le calcium urinaire est souvent normal dans les phases de reconstruction. La connaissance de ces deux manifestations est importante, car elle conditionne la thérapeutique.

KRANE a étudié l'élimination des hypropeptides chez les Pagétiques (39) à hydroxyprolinurie particulièrement élevée (125 à 980 mg/24 h.). Il a mis en évidence, par analyse chromatographique, des peptides (PM 3000) plus gros que ceux trouvés ordinairement. Une étude isotopique permet de penser que ces fragments de collagène ont bien été rapidement synthétisés, mais non inclus dans les molécules de tropocollagène.

Il faut rapprocher cette observation des résultats que nous avons obtenus après séparation des hypropeptides par chromatographie sur colonne de Séphadex qui nous montraient l'augmentation importante du 3e pic isolé chez un malade atteint de maladie de PAGET.

Nous représentons sur les figures 28 et 29 la répartition des résultats d'HP totale et libre chez des malades atteints de PAGET.

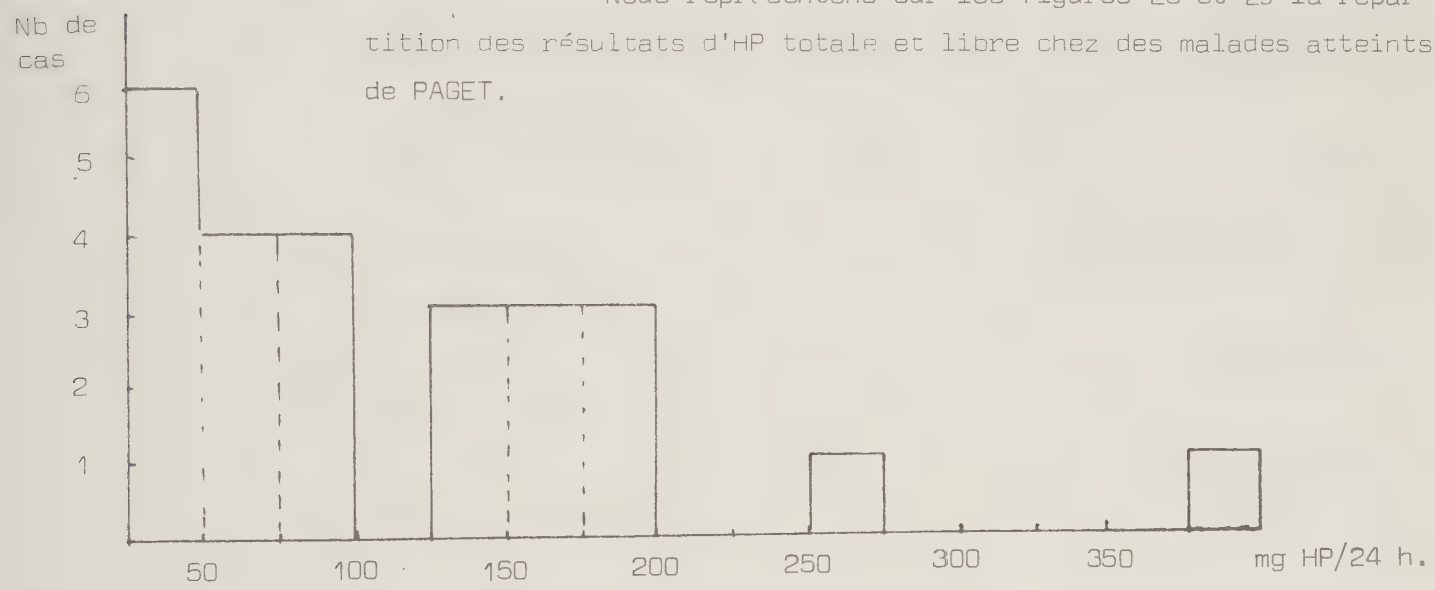


Fig. 28 - Courbe de répartition des résultats de l'HP totale chez des pagétiques

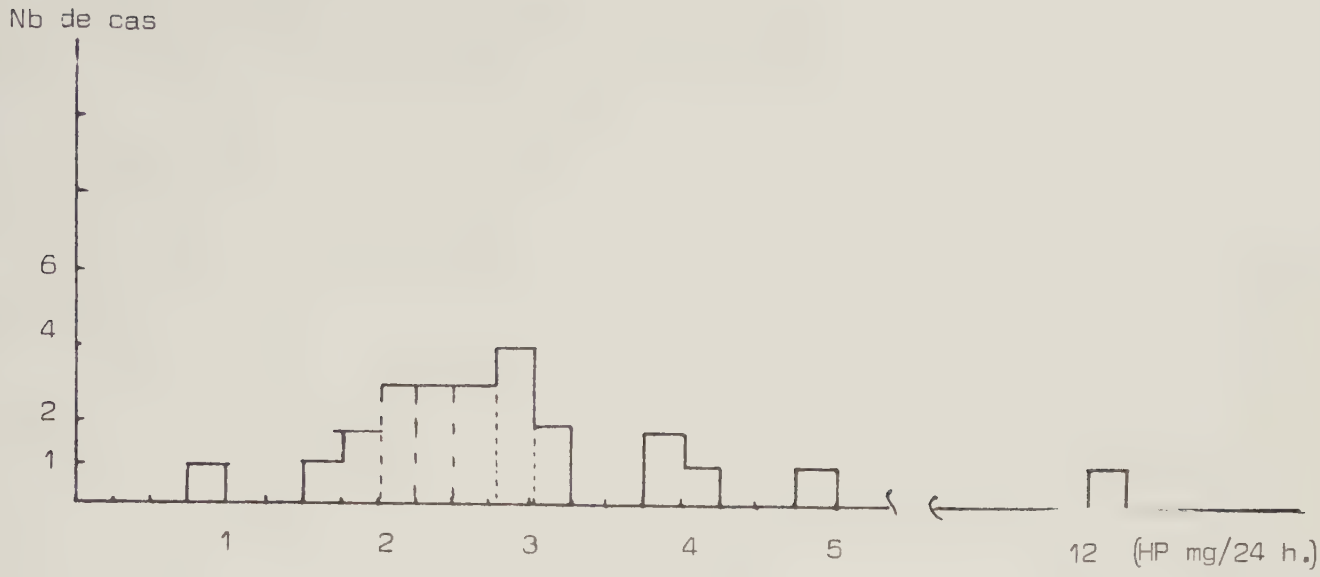


Fig. 29 - Courbe de répartition des résultats de l'HP libre chez les pagétiques

4° - Cancer avec métastases osseuses

Dans les cancers de tissus mous sans métastases osseuses, le taux de l'HP urinaire est en général normal. Par contre il s'élève en cas d'atteinte osseuse. Il existe une relation entre la diffusion des lésions et le taux de l'HP urinaire (67) (7), alors qu'il n'existe aucune relation avec le taux et la calciurie.

L'évaluation de l'HP urinaire peut ainsi aider au diagnostic de métastase osseuse et à suivre l'effet d'une thérapeutique.

LEROY donne une moyenne de 79 mg par 24 heures sur 238 cas.

Nous avons dosé l'HP chez 24 malades pour lesquels on avait porté le diagnostic de métastases osseuses. La moyenne

des résultats trouvés est de 91 mg/24 h. pour l'HP totale et de 3 mg/24 h. pour l'HP libre. (Fig. 30 et 31).

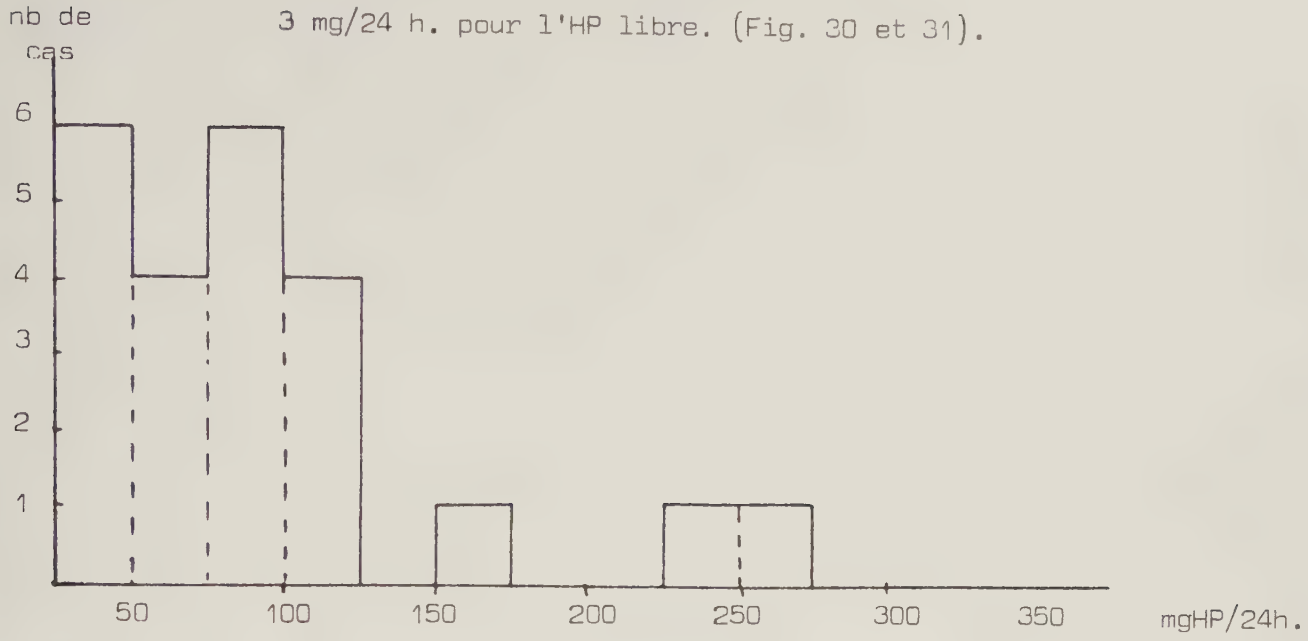


Fig. 30 - Courbe de répartition des résultats de l'HP totale chez des cancéreux avec métastases osseuses.

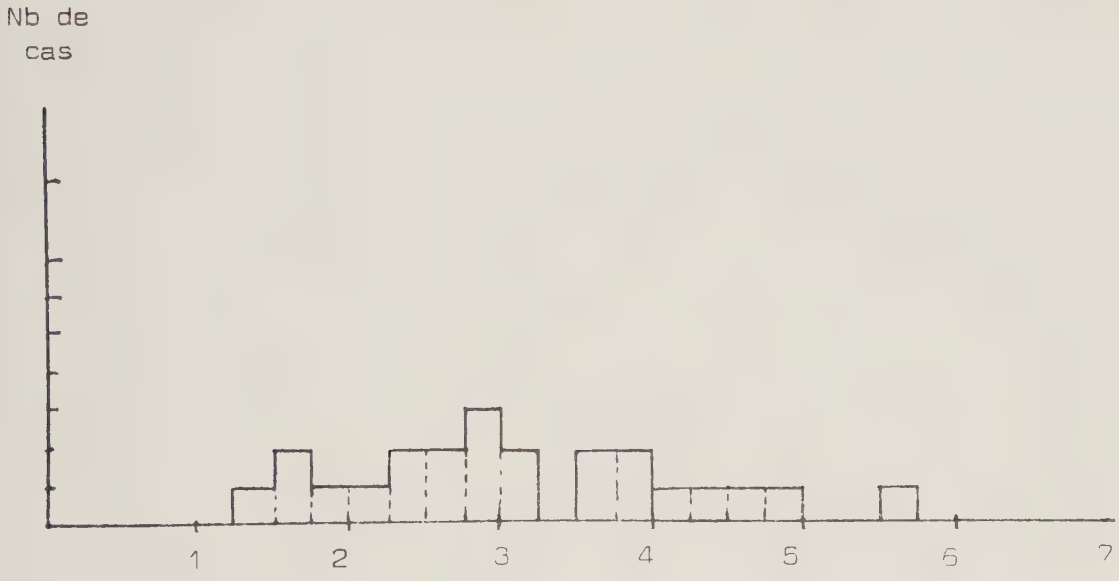


Fig. 31 - Courbe de répartition des résultats de l'HP libre chez des cancéreux avec métastases osseuses.

5° - Myélomes

Dans les myélomes, les taux observés sont en principe également assez élevés et en rapport avec la destruction osseuse. HIOCO donne une moyenne de 47 mg ± 17/24 h., dans cinq cas étudiés. Sur les cinq cas que nous avons étudiés, deux seulement présentent une forte élévation (80 et 102 mg/24 h.) et l'un de ceux-ci a une image radiologique caractéristique avec des géodes très marquées ; les trois autres ont des résultats normaux.

6° - Para Ostéo Arthropathies

Nous avons effectué des dosages d'HP urinaire chez des malades ayant subi un traumatisme osseux et chez lesquels on suspectait la formation d'ostéomes. Les chiffres que nous avons trouvés sont généralement très élevés, et, sur un total de 28 malades suspects, la moyenne de l'HP totale est de 132 mg/24 h. et 4,1 mg/24 h. pour l'HP libre (Fig. 32 et 33).

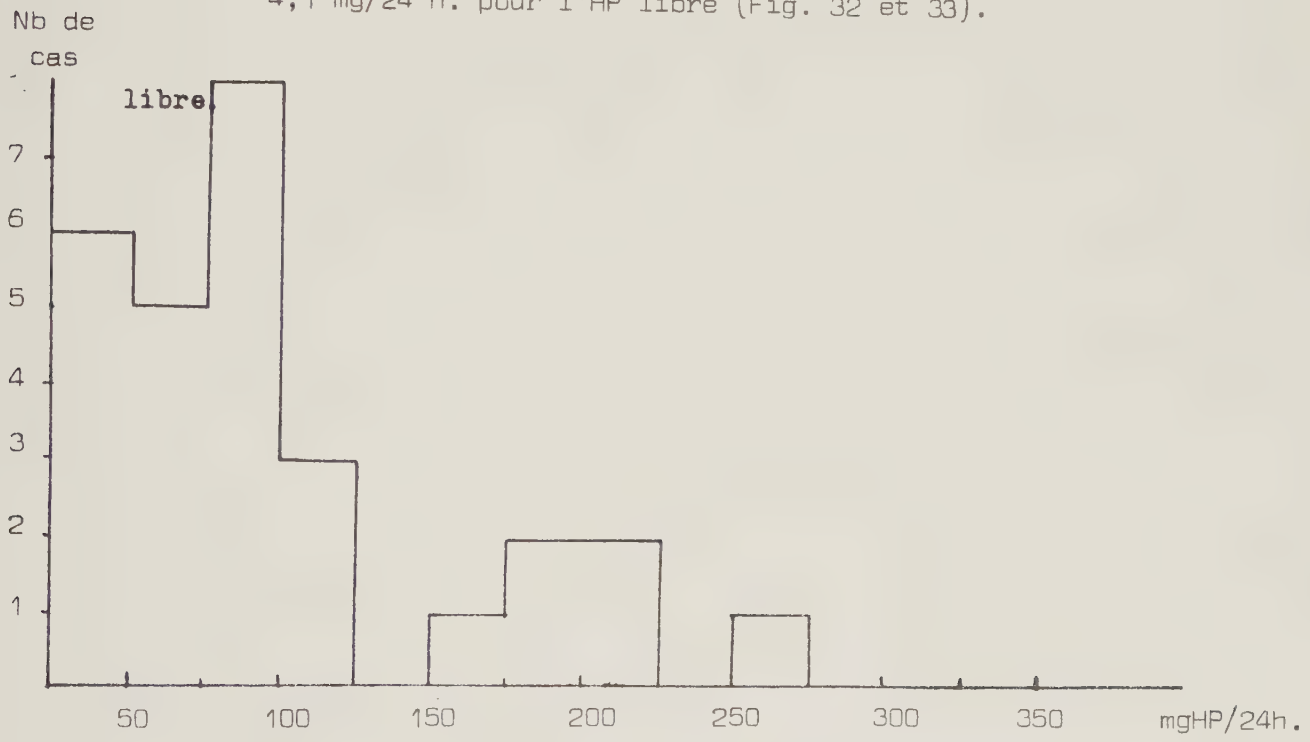


Fig. 32 - Courbe de répartition des résultats de l'HP totale chez des malades présentant une para ostéo arthropathie.

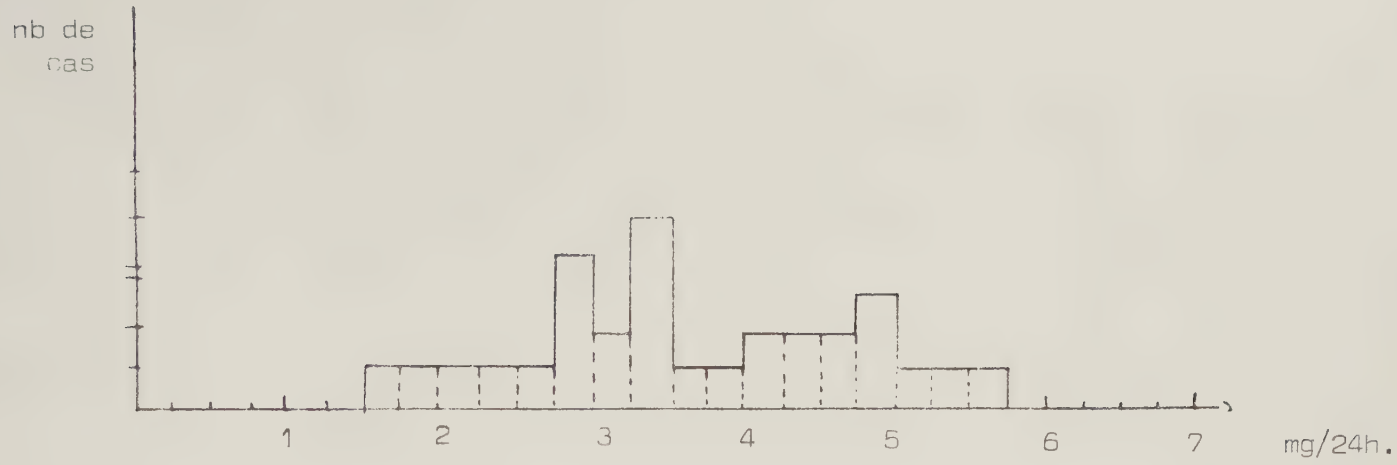


Fig. 33 - Courbe de répartition des résultats de l'HP libre chez des malades présentant une para ostéo arthropathie.

De nombreux auteurs semblent admettre qu'une élévation de l'HP urinaire reflète une destruction (7) plutôt qu'une formation osseuse. Comme d'autres, cette opinion ne nous paraît pas fondée car, bien souvent, destruction et régénération ont lieu simultanément, comme l'a montré l'étude microscopique de lésions osseuses ; de plus, la destruction osseuse stimule une régénération accrue et vice-versa.

L'augmentation de l'hydroxyproline urinaire peut donc, à notre avis, résulter de l'un ou l'autre phénomène, et traduit plutôt un métabolisme intense de la matrice osseuse.

B - Affections Parathyroïdiennes

Les phénomènes de résorption osseuse sont prédominants dans l'hyperparathyroïdie, expliquant ainsi une élévation de l'hydroxyprolinurie dans les atteintes parathyroïdiennes.

LEROY donne une moyenne de 88 mg/24 h. pour 22 malades étudiés, avec des valeurs extrêmes de 477 mg. HIOCO donne 132 mg par 24 heures dans six cas accompagnés de lésion osseuse.

On a remarqué l'augmentation relativement importante de l'HP libre parfois accompagnée d'une HP libre sérique normale, que pourrait expliquer l'action rénale de la parathormone augmentant la cléarance de l'HP libre (36) (31). Grâce aux radioisotopes on a pu montrer qu'on avait à la fois une augmentation de la vitesse de dégradation du collagène soluble et du collagène insoluble (3). Après l'ablation d'adénomes parathyroïdiens, on observe une chute de l'hydroxyprolinurie et l'on possède ainsi un bon test d'efficacité de l'intervention qui, pour certains, (31) est plus sensible que la diminution de l'activité phosphatasique ou la radiologie osseuse.

Nous n'avons eu que peu de malades suspects d'hyper parathyroïde. Sur 8 sujets suspects, deux seulement présentaient des taux d'hydroxyproline totale supérieurs à la normale (54 mg/24 h et 82 mg/24 h.). Par contre, les taux d'hydroxyproline libre sont particulièrement élevés pour certains sujets, ce qui nous donne une moyenne générale très nettement au-dessus de la normale, soit 7,5 mg/24 heures.

C - Autres glandes endocrines

Il s'agit en particulier de la thyroïde dont les hyper-fonctionnements sont souvent accompagnés d'une hyper-hydroxyprolinurie sans rapport semble-t-il avec l'atteinte osseuse. L'hypothyroïdie serait marquée par une hypo-hydroxyprolinurie, ce signe étant surtout utile pour le dépistage chez l'enfant (36) (78). Chez l'adulte en effet, les taux normaux étant plus bas, la diminution est bien souvent plus difficile à constater.

KIVIRIKKO et coll. (35) ont trouvé une bonne corrélation entre l'iode protéique sanguin et l'hydroxyproline urinaire chez les malades hypo ou hyper-thyroïdiens.

En outre, l'action de la thérapeutique peut être suivie par le taux urinaire de l'imino-acide, d'où l'intérêt de son dosage.

Nous avons dosé l'hydroxyproline chez 3 sujets présentant une hypothyroïdie. Chez le premier, celle-ci coïncidait avec une maladie de Paget, et nous avons trouvé un chiffre légèrement supérieur à la normale de 48 mg/24 h. Par contre, chez les deux autres, l'abaissement était net, 4 et 6,5 mg/24 h. pour l'HP totale et 0,7 et 0,3 mg/24 h. pour l'HP libre.

Dans le cas d'une hyper-sécrétion d'hormones somatotropes (acromégalie),on note en principe une élévation de l'HP urinaire et plasmatique ; chez un sujet présentant une acromégalie confirmée, nous avons trouvé 119 mg/24 h. d'HP totale et 3,1 d'HP libre. De même l'hypopituitarisme de l'enfant serait marqué par une baisse du taux urinaire (30), plus difficile à évaluer chez l'adulte. Nous avons observé deux cas d'hypopituitarisme chez des enfants chez lesquels les taux étaient assez bas (16 mg d'HP totale pour chacun des malades). Ici encore il est possible de suivre les effets du traitement grâce à l'HP.

L'action des oestrogènes est accompagnée d'une baisse de l'HP dans l'urine, ce que nous avons pu vérifier dans les traitements des cancers avec métastases osseuses. Cette action des oestrogènes est également notée lors de leur administration dans l'acromégalie, l'hyperthyroïdie et l'hyper-para-thyroïdie.

Jusqu'ici nous ne pensons pas que des modifications de l'HP consécutives à des troubles surrénaliens ou des glandes génitales aient été constatées (5) (48).

D - Troubles de la croissance chez l'enfant

Les modifications de l'HP urinaire sont souvent plus nettes chez l'enfant que chez l'adulte, du fait des taux normaux plus élevés jusqu'à vingt ans ; dans les retards de croissance dus à des causes hormonales, génétiques ou nutritionnelles, on note souvent une diminution de l'HP urinaire. Certains auteurs ont même proposé un index permettant d'apprécier le degré de retard de crois-

sance, par exemple WHITEHEAD (81) : $\frac{HP}{créatinine}$ x poids - la valeur du produit serait en excellente corrélation avec le degré de retard de croissance dû à une malnutrition.

LEROY donne les moyennes suivantes :

- malnutritions 13 mg/24 h.
- Kwashiorkor 8 mg/24 h.
- Rachitisme 23 mg/24 h.
- Hypothyroïdisme 10 mg/24 h.

E - Maladie du collagène

Dans le lupus érythémateux disséminé, la sclérodermie, la dermatomyosite, la périarthrite chronique évolutive, différentes études font état de résultats normaux ou d'élévations peu significatives de l'hydroxyprolinurie.

LEROY indique les moyennes suivantes exprimées en mg/24 h. : 40 pour la sclérodermie, 49 pour la dermatomyosite, 36 pour l'arthrite rhumatoïde avec des valeurs nettement plus élevées dans quelques cas particuliers.

Dans les épisodes inflammatoires, les éliminations semblent plus élevées, mais ce caractère n'est pas spécifique.

De légères modifications des hypropeptides urinaires sont signalées par MEILMAN (51), dans le cas du lupus érythémateux.

Notre expérience de quelques cas nous a donné les résultats suivants :

- Sclérodermie (3 cas) moyenne : 46 mg/24 h.
- Dermatomyosite (3 cas) " : 26 mg/24 h.
- Arthrite rhumatoïde (6 cas) " : 35 mg/24 h.
- Lupus érythémateux (7 cas) " : 33 mg/24 h.
- P.C.E. (3 cas) " : 30 mg/24 h.

Ainsi nous obtenons le plus souvent des résultats plutôt à la limite supérieure de la normale avec des taux légèrement supérieurs dans la sclérodermie.

Dans les quelques études entreprises sur les maladies de peau et en particulier le psoriasis, de rares augmentations de l'hydroxyprolinurie ont été constatées. LEROY (26) indique une moyenne d'élimination de 55 mg/24 h. avec des valeurs extrêmes de 12 à 130.

Sur 12 cas de psoriasis, nous avons relevé des taux variables le plus souvent normaux, avec une moyenne de 30 mg/24 h.

F - Affections diverses

De nombreuses publications traitent des variations de l'hydroxyproline dans diverses affections telles que : malabsorptions (38), sarcoïdose (47), carcinoïdose (53), maladie de Hodgkin (44).

Signalons pour terminer, des déviations congénitales du métabolisme par déficit en hydroxyproline oxydase, amenant une augmentation de l'imino acide dans le sang et dans les urines. EFRON (14) cite un cas caractérisé du point de vue clinique par une arriération mentale profonde, sur lequel il n'a pas été possible de faire une étude génétique.

CONCLUSIONS

Les principaux résultats obtenus au cours de notre étude sur les propriétés analytiques et biochimiques de l'hydroxyproline peuvent être classés en trois rubriques.

1 - Au point de vue analytique

Nous avons mis au point une méthode de dosage de l'hydroxyproline libre et peptidique dans l'urine réalisable par une technique manuelle ou automatisée dont nous avons vérifié la spécificité, la reproductibilité et la précision. Nous avons également effectué des études préliminaires à l'application de la méthode à d'autres liquides biologiques, notamment le sang. Les résultats obtenus par spectrofluorimétrie nous paraissent dignes d'être exploités dans une étude ultérieure.

Pour l'exploration en chimie clinique, la détermination de l'hydroxyproline totale paraît généralement suffisante, mais la séparation de peptides (ou de groupes de peptides) apporte des précisions intéressantes dans certains cas pathologiques (Paget, cancers avec métastases osseuses). A cet égard, la méthode d'isolement par chromatographie d'exclusion sur gel de séphadex, que nous proposons, permet de réaliser un fractionnement partiel mais néanmoins exploitable.

2 - Au point de vue physiologique

L'étude de plus de 600 sujets normaux nous a permis de définir valablement des moyennes et des variations physiologiques de l'hydroxyproline libre et totale en faisant intervenir le sexe, l'âge et les facteurs alimentaires ; nous avons remarqué, aussi bien chez les hommes que chez les femmes, l'existence de deux sous-popu-

lations dont l'origine pourrait être recherchée dans l'alimentation. Une différence d'excrétion urinaire de l'hydroxyproline existe entre les hommes et les femmes, mais elle est trop légère pour être significative, et des normales communes aux deux sexes peuvent être adoptées. Par contre, les variations du taux en fonction de l'âge sont importantes et doivent être absolument prises en considération pour la recherche des manifestations pathologiques. Les variations nycthémérales décrites par certains auteurs ne nous ont pas paru évidentes, et les dosages effectués sur l'élimination totale des 24 heures nous semblent suffisants en chimie clinique.

3 - Au point de vue pathologique

Il est évident que la pathologie osseuse influence au premier chef l'hydroxyprolinurie. Sur plus de deux cents cas anormaux, la majeure partie peut être rapportée à une atteinte de l'os, sans qu'on puisse imputer la décharge de l'imino-acide dans l'urine à une dégradation ou à une synthèse accélérée du tissu osseux, ces deux mécanismes étant d'ailleurs généralement liés. C'est dans les maladies de Paget, les métastases osseuses de cancer, les myélomes et les paraostéoarthropathies que les valeurs les plus élevées (plusieurs centaines de mg par 24 heures) ont été trouvées. Bien que plus faibles, des augmentations ont été également constatées dans certaines ostéoporoses et ostéomalacies.

Les affections des glandes endocrines atteignent également le métabolisme de l'hydroxyproline, comme nous l'avons constaté pour les parathyroïdes, la thyroïde, l'antéhypophyse. Quant aux maladies du collagène (lupus érythémateux, sclérodermie, dermatomyosite ...), malgré leur origine, elles n'apportent que de faibles élévations de l'hydroxyprolinurie, sauf dans les épisodes inflammatoires aigus. Ce fait provient vraisemblablement du métabolisme relativement lent du collagène de la peau comparé à celui de l'os.

Cette étude des variations physiologiques et pathologiques de l'hydroxyproline dans l'organisme doit être poursuivie dans plusieurs voies :

- mise au point de techniques de dosage plus sensibles permettant l'exploration des variations de l'imino-acide dans le sang et les tissus.
- fractionnement des hypropeptides pour apprécier l'intensité, dans diverses maladies, des phénomènes de dégradation du collagène, caractérisés par une décharge urinaire de fragments de poids moléculaire plus ou moins élevé.
- poursuite des explorations dans divers syndromes pathologiques avec étude des corrélations entre l'hydroxyproline et d'autres constituants (calcium, phosphore, phosphatases, thyroxine ...).

C'est dans ces directions que s'orientent les recherches actuelles effectuées au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Saint-Louis.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALLISON D.J. WALKER A., SMITH Q.T., Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 729

2 - ANDERSON J., BANNISTER D.W., TOMLINSON R.W.S., Clin. Sci. 1965, 29, 583

3 - AVIOLI L.V., PROCKOP D.J., J. Clin. Invest., 1967, 46, 217

4 - BARTOS, Pharm. Weekblad, 1958, 93, 594, 596

5 - BENOIT F.L., THEIL G.B., WATTEN R.H., Métab. Clin. Explt. 1963, 12, 1072

6 - BERGMAN M., LOXLEY R., Anal. Chem. 1963, 35, 1961

7 - BONADDONA G., MERLINO M.J., MYERS W.P.L., SONENBERG M., New Engl. J. Med. 1966, 275, 298

8 - BOREL J.P., CARANJOT J.M., JAYLE M.F., Clin. Chim. Acta 1967, 16,709

8 bis - BORNSTEIN P. - Biochemistry, 1967, 6, 3082

9 - BRUNISH R., SOERENSEN B., Dermatologica 1965, 130, 165

10 - DREUX C., LEYMARIE J., Ann. Biol. Clin. 1968, 26, 641

11 - DUBOVSKY J., DUBOSKA E., PACOVSKY V., HRBA J., Clin. Chim. Acta 1968, 19, 38

12 - DULL T.A., HENNEMAN P.H., New. Engl. J. Med. 1963, 268, 132

13 - EASTOE J.E., Biochem. J. 1955, 61, 589 et 1957, 65, 363

14 - EFRON M.L., BIXBY E.M., PRYLES C.V., New. Engl. J. Med. 1965, 272, 1299

15 - FILLIAT M., COTTE U., BRUNET M., Pathol. Biol. 1966, 14, 762

16 - FISCHER E., Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1902, 35, 2660

17 - FREY J. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 111, 440

18 - FREY J., HOAN, GRAS J., HENRY J.C., GUDEFIN Y., Science 1965, 150, 751

19 - FREY J., PADIEU P., Bull. Soc. Chim. Biol. 1967, 49, 1221

20 - Mc GALE E.H.F., JEVONS F.R., Clin. Chim. Acta, 1967, 17, 441

21 - GERBER G., ALTMAN K.I., J. Biol. Chem. 1960, 235, 2653

22 - GRANT R.A., HATHORN M., GILLMANN J., Biochem. J. 1960, 186, 549

23 - HANSON, WIEDERANDERS, Clin. Chim. Acta, 1969, 25, 255

24 - HARPER H.A., Précis de Biochimie - Traduction Française. A. Colin ed. Paris 1965

25 - HARRINGTON W.F., HIPPEL P.H. dans Advances in Protein chemistry, Ac. Press. ed. N.Y. 1961

26 - HARTMAN F., Klin. Wochsch. 1966, 44, 1053

27 - HIOCO D., GRUSON M., RYCKEWAERT A., DE SEZE S., Ann. Biol. Clin. 1967, 25, 725

28 - UURYCH J., CHUAPIL M., Biochim. Biophys. Acta 1965, 91, 107

29 - JACKSON D.S. et BENTLEY J.P., J. Biophys. Biochem. cytol. 1960, 7, 37

30 - JASIN H.E., FINK C.W., WISE W., ZIFF M.J. Clin. Invest. 1962, 41, 1928

30 bis- KAKIMOTO Y., AKAZAWA J., J. Biol. Chem. 1970, 245, 5751

31 - KALIMA T., KIVIRIKKO K.I., LAITINEN O., UITTO J., Clin. Chim. Acta 1968, 19, 443

32 - KATZ F.H., KAPPAS A., The J. of. Lab. and. Cl. Med. 1968, 71, 65

33 - KENDREW J.C. dans The proteins de NEURATH H., et BAILEY K., Vol. II part. B., Acad. Press. ed. N.Y. 1956

34 - KIBRICK A.C., HASHIRO C.Q., SAFIER L.B., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962, 109, 47

35 - KIVIRIKKO K.I., LAITINEN O., LAMBERG B.A. J. Clin. endocrinol. Metab. 1965, 25, 1347

36 - KIVIRIKKO K.I., LAITINEN O. Ann. Poediat. Fenn. 1965, II, 148

37 - KOWALEWSKI K., Acta Endocrin. 1965, 50, 34

38 - KOWLESSAR O.D., HAEFFNER L.J., BRONSTEIN H.D., J. Clin. Invest. 1964, 43, 127

39 - KRANE M.S., MUNOZ A.J. HARRIS E.D., Science 1967, 157, 713

39 bis- KÜHN K. Essays in biochemistry 1969, vol. 5, 59

40 - LANG K., Z. Physiol. Chem. 1933, 219, 148

41 - LENZI F., RAVENNI G., RUBEGNI M., DEL GIOVANE L., Pan minerva Med. 1963, 5, 155

42 - LEROY E.C., KAPLAN A., UDENFRIEND S., SJOERDSMA A., J. Biol. Chem. 1964 239, 3350

43 - LEROY E.C., dans Advances in clinical chemistry vol. 10, 213, Ac. Press N.Y. ed 1967

44 - LEROY E.C., CARBONE P.P., SJOERDSMA A., J. Lab. Clin. Med. 1966, 67,891

45 - LINDSTEDT S., PROCKOP D.J., J. Biol. Chem. 1961, 236, 1399

46 - MARTIN C.J., AXELROD A.E., Proc. Soc. Exp. Biol. 1953, 83, 461

47 - MASSARD D., HANDLER A.E., KATZ S., YOUNG R.C. Am. Rev. Respir. Diseases 1966, 93, 929

48 - MATIASEVIC D., GERSHBERG H., Metabolism. 1966, 15, 720

49 - MECHANIC G.L., SKUPP S.J., SAFIER L.B., KIBRICK A.C., Arch. Biochem. 1960, 86, 71

50 - MECHANIC G.L., LEVY M., J. Amer. Chem. Soc. 1959, 81, 1889

51 - MEILMAN E., URIVETSKY M.M., RAPAPORT C.M., J. Clin. Invest. 1963, 42, 4

52 - MITOMA C., SMITH T.E., DAVIDSON J.D., UDENFRIEND S., DACOSTA F.M., SJOERDSMA A., J. Lab. Clin. Med. 1959, 53, 909

53 - MILLER E.J., PIEZ K.A., Anal. Biochem. 1966, 16, 320

54 - MAUTALEN, CARLOS, Journal L. Clin. Med. Jan. 70, II

55 - MOORE S., STEIN W. H., J. Biol. Chem. 1951, 192, 663 et 1954, 211, 893

56 - MORROW G., KIVIRIKKO K.I., PROCKOP D.J., J. Clin. Endoc. 1966, 26, 1012

57 - MOSKOWITZ R.W., KLEIN L., KATZ D., Arthritis rheum. 1965, 8, 61

58 - NEUMANN R.E., LOGAN M.A., J. Biol. Chem. 1950, 184, 299

59 - OGLE J.D., ARLINGHAUS R.B., LOGAN M.A., J. Biol. Chem. 1962, 237, 3667

60 - PADIEU P., MALEKNIA N., Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, 47, 493

61 - PARTRIDGE S.M., dans Biochimie et physiologie du tissu conjonctif de COMPTE P., ORMECO et Imprimerie du sud-est ed. Lyon 1966

62 - PETER KOFSKY, UDENFRIEND S., Biochem., Biophys. Res. Commun. 1961, 6, 184

63 - PIEZ K.A., EIGNER E.A., LEWIS M.S., Biochemistry 1963, 2, 58

64 - PIEZ K.A., LIKINS R.L., J. Biol. Chem. 1957, 229, 101

65 - PIEZ K.A., MORRIS L., Anal. Biochem. 1960, 1, 187

66 - PLAQUET R., BISERIE G., BOULANGER P., Bull. Soc. Chim. Biol. 1960, 42 - 393

67 - PLATT W.D., DOOLITTLE L.H., HARTSHOR J.W.S., New. Engl. J. Med. 1964 271, 287

68 - PROCKOP D.J. et KIVIRIKKO K.I., Ann. of Int. Med. 1967, 66, 1243

69 - PROCKOP D.J., J. Clin. Invest. 1964, 43, 453

70 - PROCKOP D J. et SJOERSMA A., J. Clin. Invest. 1961, 40, 843

71 - PROCKOP D.J., UDENFRIEND S., Anal. Biochem. 1960, 1, 228

72 - RADHAKRISHNAN A.N., MEISTER A., J. Biol. Chem. 1957, 226, 559

73 - RICH A., CRICK F.H.C., Nature 1955, 176, 915

74 - SALEH A.E.C., COENEGRACHT. J.M., Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 445

75 - SJOERDSMA A., UDENFRIEND S., KEISER H. LEROY E.C., Ann. Internal. Me 1965, 63, 672

76 - SMITH E.L. dans The enzymes vol. 1, part 2 p. 862, Acad.

76 bis - STARK M., KUHN K. Eur. J. Biochem. 1969, 6, 534

77 - STEGEMANN H., Z. physiol. Chem. 1958, 311, 41

77 bis - TRISTAN G.R., SMITH R.H., The Proteins, Ac. Press N.Y. ed. 1963, p. 46-50

78 - UITTO J., LAITINEN O., LAMBERG B.A., KIVIRIKKO KI.I, Clin. Chim. Acta 1968, 22, 583

79 - VEIS A., ANESEY J., J. Biol. Chem. 1965, 240, 3899

80 - WATSON J.D., Science 1963, 140, 17

81 - WHITEHEAD R.G., Lancet 1965, 11, 567

82 - WOESNNER J.F., Arch. Biochem. Biophys. 1961, 93, 440

83 - ZIFF M., KIBRICK A., DRESNER E., GRIBETZ H.J., J. Clin. Invest. 1956 35, 579